



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Instituto de Anatomia Patológica

### **Abordagem ao Cancro da Mama Triplo Negativo: Paradigma Atual e Perspetivas Futuras**

Jorge André Agostinho Alves Correia

---

**Junho 2018**



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Instituto de Anatomia Patológica

### **Abordagem ao Cancro da Mama Triplo Negativo: Paradigma Atual e Perspetivas Futuras**

Jorge André Agostinho Alves Correia

**Orientado por:**

Dr.ª Maria de Lurdes Correia da Encarnação

---

**Junho 2018**

## Resumo

O cancro da mama triplo-negativo (TNBC) insere-se num conjunto heterogéneo de tumores definido pela ausência de expressão do recetor de estrogénio (ER), recetor de progesterona (PR) e recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2).

O TNBC caracteriza-se por uma história natural agressiva, sendo responsável por cerca 20% de todos os cancros da mama invasivos. Tem sido associado à raça africana, idade mais jovem, obesidade, alto grau histológico e estadio mais avançado à data do diagnóstico.

Considerando a escassez de moléculas alvo e farmacologia dirigida, o tratamento sistémico padrão baseia-se em regimes quimioterapêuticos de antraciclina e taxanos. O TNBC evidencia alta quimio-sensibilidade, tal como comprovam as elevadas taxas de resposta completa patológica (pCR) obtidas após a quimioterapia neoadjuvante. Este tipo de abordagem, nalguns casos, permite ainda a realização de cirurgia conservadora da mama. Subsequentemente, observam-se taxas mais elevadas e precoces de recidiva à distância comparativamente com os restantes subtipos de cancro da mama, apresentando uma taxa sobrevivência precária, uma vez que as opções terapêuticas limitadas estão associadas a uma fraca resposta e de curta duração.

Recentemente, foram identificadas características moleculares preponderantes no sentido de subdividir o espectro do TNBC mais aprofundadamente, possibilitando o desenvolvimento de terapêuticas sistémicas dirigidas de acordo com as suas diferentes subclasses e distintas vias biológicas alteradas, tais como a proliferação, reparação do DNA, apoptose, angiogénese, imuno-modelação e metástase.

Consequentemente, várias são as abordagens atualmente sob investigação, entre elas inibidores de checkpoint imune, agentes da família das Platinas, inibidores Poli-ADP-ribose polimerase (PARP), inibidores da via PI3K-Akt-mTOR, inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inibidores do recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e inibidores do recetor androgénio (RA).

Até 20% das doentes diagnosticadas apresentam mutações na linhagem BRCA, denominado o fenótipo “BRCAness”, que pode ser utilizado para selecionar casos com maior probabilidade de responder a terapias de danificação do DNA, como as Platinas e/ou inibidores da PARP.

Existe um subgrupo de TNBC que evidencia elevado grau de linfócitos infiltrantes do tumor (TIL), correlacionando-se com menor risco de recidiva da doença e maior probabilidade de sucesso da quimioterapia. Neste contexto, alguns inibidores de checkpoint imune, incluindo os inibidores PD-1 e PD-L1, estão sob investigação no cenário de TNBC metastático.

Durante esta revisão, serão discutidos a epidemiologia, fatores de risco, história natural da doença, variáveis prognósticas, estadiamento, características imagiológicas, clínicas, biopatológicas e moleculares do TNBC. Adicionalmente, serão abordadas as opções de terapêuticas preconizadas atualmente e possíveis estratégias de tratamento futuras, desenvolvidas de acordo com as características particulares de cada subtipo de TNBC e que em breve poderão assumir uma considerável preponderância na obtenção de *outcomes* mais profícuos.

**Palavras-chave:** #Cancro da mama triplo negativo #Biomarcadores #Biopatologia #Subtipos moleculares #Linfócitos infiltrantes do tumor #Terapêutica dirigida #Terapia combinada

**“O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML”.**

## **Abstract**

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous group of tumors defined by the lack of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2).

TNBC is characterized by an aggressive natural history and accounts for around 20% of all invasive breast cancers. It has been associated with African race, younger age, obesity, histologic higher grade and more advanced stage at diagnosis.

Due to lack of drug-targetable receptors, chemotherapy with anthracycline and taxane-based chemotherapy has been the mainstay of the recommended systemic treatment. TNBC is sensitive to chemotherapy as demonstrated by high pathological complete response (pCR) rates achieved after neoadjuvant chemotherapy. This approach also allows for breast-conserving surgery, in some cases. Subsequently, early and higher rates of distant relapse are observed in TNBC when compared to other breast cancer subtypes, showing poor overall survival, since treatment options are few, response rates are weak and lack durability.

Important molecular characteristics have now been identified that can further subclassify TNBC, possibly providing alternative systemic target-therapies for each subclass that encompasses several biological processes, such as proliferation, DNA repair, apoptosis, angiogenesis, immune modulation and metastasis.

Various therapeutic approaches are consequently being investigated, including immune checkpoint inhibitors, platinum compounds, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, PI3K pathway inhibitors, vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors, epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors and androgen receptor (AR) inhibitors.

Up to 20% of patients diagnosed have germline BRCA mutations, called “BRCAness” phenotype, which can be used to select patients likely to respond to DNA-damaging therapy, such as platinum and/or PARP inhibitors.

A subgroup of TNBCs shows a high degree of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), that also correlates with a lower risk of disease relapse and a higher likelihood of benefit from chemotherapy. Immune checkpoint inhibitors, including PD-1 and PD-L1 inhibitors, are under investigation in the setting of metastatic TNBC.

In this review, it will be analyzed the epidemiology, risk factors, natural history, prognostic variables, staging, imagiological features, clinical, biopathologic and molecular characteristics of TNBC. Furthermore, it will be discussed current standard treatment options and emerging therapeutic strategies that aim to match each distinct subclasses of TNBC, which are of utmost importance as researchers design future approaches to improve patient outcome.

**Key-words:** #Triple-negative breast cancer #Biomarkers #Biopathology #Molecular subtypes #Tumor infiltrating lymphocytes #Targeted therapy #Combination therapy

**“O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML”.**

# Índice

Abreviaturas .....	6
Introdução.....	7
Tipos de Cancro da Mama .....	8
Métodos .....	10
Discussão .....	11
Generalidades e Epidemiologia dos TNBC .....	11
Fatores de Risco.....	12
Apresentação Clínica .....	13
Padrão de Metastização .....	14
Padrão de Recidiva .....	15
Características Imagiológicas.....	16
Estadiamento .....	18
Classificação Molecular .....	20
Biopatologia .....	22
Fatores Prognósticos .....	26
Tratamento do Cancro da Mama Triplo Negativo .....	29
Cirurgia e Radioterapia.....	29
Tratamento Sistémico – Quimioterapia .....	30
Quimioterapia em contexto de doença metastática .....	31
O futuro da abordagem terapêutica .....	32
Agentes da família das Platinas.....	32
Inibidores Poli-ADP-ribose polimerase (PARP) .....	33
Recetores tirosina-cinase (RTK) .....	34
Inibidores do EGFR.....	34
Inibidores do fator de crescimento endotelial vascular .....	35
Inibidores da via PI3K-Akt-mTOR.....	35
Imunoterapia .....	36
Inibidores do recetor de androgénio (RA) .....	37
Conclusão .....	38
Agradecimentos .....	39
Anexo I .....	40
Anexo II.....	41
Bibliografia.....	42

## Abreviaturas

BL 1/2 – Tipo basal 1 e 2

BLBC – Tumores do tipo basal

CMR – Cirurgia conservadora da mama seguida por radioterapia

CTLA-4 – Antigénio associado aos linfócitos T citotóxicos 4

DCIS – Carcinoma ductal *in situ*

DGS – Direção Geral de Saúde

EGFR – Recetor de fator de crescimento epidermal

EGF – Fator de crescimento epidermal

FISH – técnica de hibridação fluorescente *in situ*

HER2 – Recetor do fator de crescimento epidermal 2

IHC – Imunohistoquímica

IM - Imunomodelador

LAR – Luminal com recetor de androgéneo

MSL – Mesenquimal tipo estaminal

mTOR – Alvo da rapamicina nas células de mamífero

M – Mesenquimal

NB-TNBC – Tumores triplo negativos do tipo não basal

NK – Natural Killer

Non-BLBC – Tumores fora do espectro do tipo basal

NST - Carcinomas invasivos de nenhum tipo específico

NTN-BLBC – Tumores do tipo basal não triplo negativos

PARP 1/2 – Poli-ADP-ribose polimerase 1 e 2

pCR - Resposta patológica completa

PD-1/2 – Recetor de morte celular programada 1 e 2

PD-L1/2 – Ligandos de morte celular programada 1 e 2

PI3K – Fosfoinosítideo 3-quinase

RA – Recetor de Androgénio

RE ou ER – Recetor de Estrogénios

RP ou PR – Recetor de Progesterona

TIL – Linfócitos infiltrantes do tumor

TN-BLBC – Tumores do tipo basal triplo negativos

TNBC – Cancro da Mama Triplo Negativo

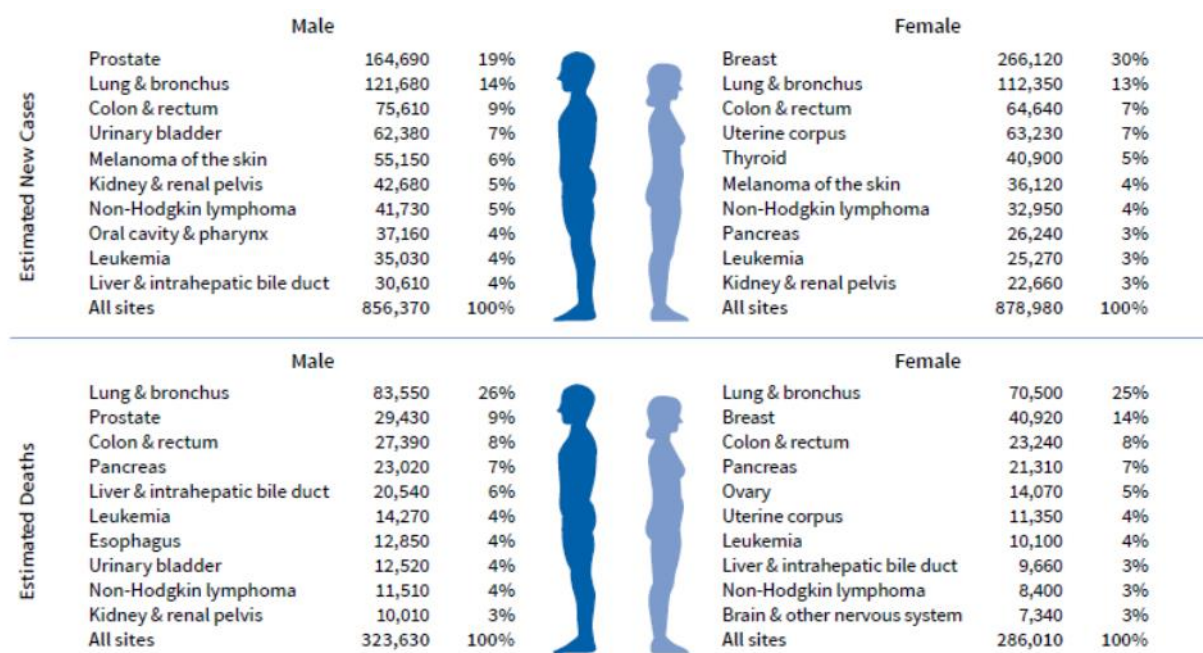
VEGFR – Receto do fator de crescimento endotelial vascular

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

WHO – Organização Mundial de Saúde

## Introdução

Numa perspetiva global, o cancro é uma patologia cuja prevalência se mantém em crescimento, destacando-se o cancro da mama como aquele que mais é diagnosticado no sexo feminino, registando 25% do total de casos mundialmente [1]. O cancro da mama tem-se evidenciado como a principal causa de morte por cancro nos elementos do sexo feminino nos países em desenvolvimento e a segunda causa de morte nos países mais desenvolvidos, a seguir ao cancro do pulmão, apesar dos variados progressos nas modalidades de diagnóstico e terapêutica, que têm permitido um declínio na taxa de mortalidade [2]. Esse panorama reflete-se nos dados registados nos EUA no ano de 2018, patente na Figura 1, em que mortalidade por cancro registada foi de 14% e 25%, para cancro da mama e do pulmão, respetivamente, com o cancro da mama a assumir a maior taxa de incidência entre todos, 30% [4]. De facto, meio milhão de mulheres morrem anualmente em todo mundo, das quais 150000 casos correspondem a cancro da mama triplo negativo, que se justifica, em parte, por não existir atualmente terapêutica dirigida eficaz para este subtipo de cancro [3]. No caso de Portugal, dados do projeto GLOBOCAN 2012 da Agência Internacional para a Pesquisa sobre Cancro concluíram que o cancro da mama corresponde a 30% do total de casos e a 16% do total de mortes por cancro no país [1].



**Figura 1.** Incidência e Mortalidade por Cancro nos EUA em 2018, dados da American Cancer Society[4].

Nos últimos anos, variadas são as áreas de investigação que procuram catalogar os diferentes subtipos de cancro da mama, partindo da premissa que, apesar do tecido de origem comum, esta patologia evidencia uma marcada heterogeneidade nas suas componentes genética e molecular, que determinam uma grande variabilidade em termos de progressão clínica, prognóstico e resposta à terapêutica [5].

## **Tipos de Cancro da Mama**

No que concerne à estratificação dos diferentes tipos de cancro da mama, pode ser feita uma divisão com base nos marcadores celulares que os caracterizam: (A) Positivos para Recetor de estrogénio (RE) ou Recetor de progesterona (RP); (B) Positivos para o Recetor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2 ou erbB2), com ou sem positividade para RE ou PR; (C) Cancro da mama triplo negativo (TNBC), definido pela ausência de expressão de RE, PR e HER2 [5].

Existem terapêuticas alvo para as categorias (A) e (B), mas escasseiam opções terapêuticas para os TNBC.

Através de imunohistoquímica (IHC) e microarrays de cDNA, foram ainda subclassificados distintos tipos de cancro da mama, com base nas duas células epiteliais de origem existentes na glândula mamária - luminal e basal. Caracteristicamente as células luminais expressam recetores de estrogénio e progesterona e são positivas para as queratinas 8/18, enquanto que as células basais e mioepiteliais são positivas para as queratinas 5/6 e 17. [6-10]

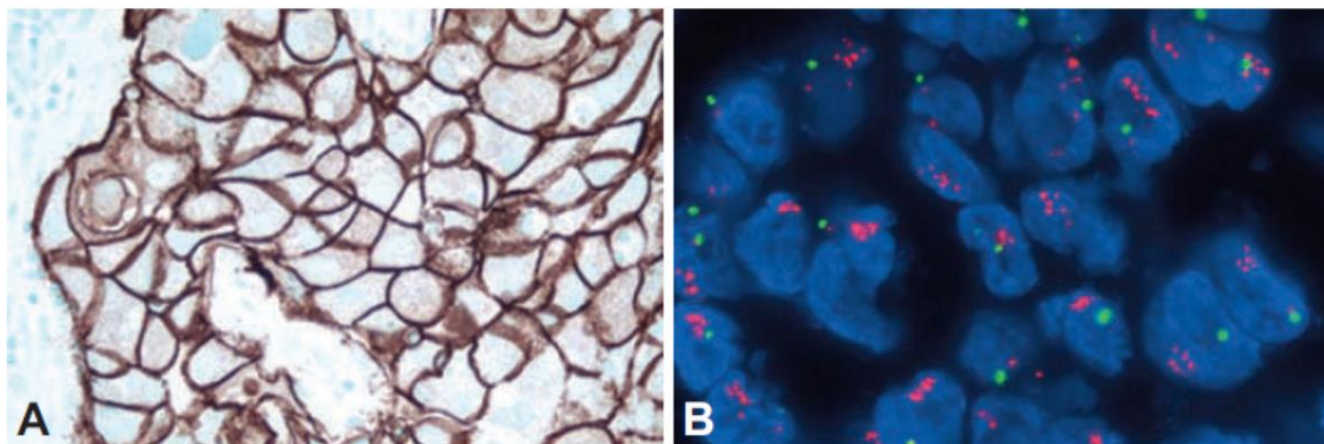
São as particularidades histopatológicas individuais que conferem diferentes prognósticos e respostas à terapêutica e permitem determinar os seis diferentes subtipos de cancro (tal como estruturado na Figura 2): (1) Luminal A (RE positivo e/ou RP positivo e HER2 negativo); (2) Luminal B (RE positivo e/ou RP positivo e HER2 positivo). (3) Sobre-expressão de HER2 (RE e RP negativos e HER2 positivo); (4) Tipo Basal (RE, RP negativos, HER2 positivo ou negativo, citoqueratina 5/6 positivos e/ou Recetor de fator de crescimento epidermal positivo (EGFR)); (5) Tipo mamário normal (normal breast like); (6) Baixo em Claudina (RE, RP, HER2 negativos, mas com positividade para marcadores mesenquimais) [5-7,11-12].



Subtypes	ER, PR and HER2 status	Other IHC features	Cell of origin	Other characteristics
Luminal A	ER + or PR + or both, HER2-	Keratin 8/18 +ve	Luminal epithelial cell	Younger age Best prognosis Low rates of recurrence Higher survival rate
Luminal B	ER + or PR + or both, HER2+	Keratin 8/18 +ve	Luminal epithelial cell	Higher tumor grade Poorer prognosis
Basal like	ER-, PR-, HER2±	Keratin 5/6/17 +ve EGFR +ve	Basal/myoepithelial cell/ bipotent progenitor	15 % Younger age Associated with hereditary BRCA 1 Poorer prognosis compared to other types Spread to axillary nodes, less common to bones
Her2+	ER-, PR-, HER2+	-	Late luminal progenitor	20-25 % Poorer grade Lymph nodes positive Early distant metastases Poor prognosis Frequent relapse
Normal breast like	Tumors that do not fit into any of these categories	-	Luminal epithelial cell	6-10 % of all breast cancers Small tumors Good prognosis More common in postmenopausal Associated with fibroadenomas
Claudin low	ER-, PR-, HER2-	Mesenchymal markers	Stem cell	5-10 % of all tumors Typically triple negative Low expression of cell-cell junction proteins (like E-cadherin) Lymphocytic infiltrates

**Figura 2.** Subtipos de Cancro da Mama [11].

A definição atual de TNBC encontra-se contemplada nas mais recentes guidelines da American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP), que se baseia na negatividade de recetores hormonais (RE/RP), com expressão inferior a <1% por IHC, e negatividade de HER2 comprovada por IHC (0-1+) ou, caso resultado IHC equívoco (2+), negatividade HER2 comprovada adicionalmente por técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) - ver Figura 3 [13, 14].



**Figura 3.** O recurso a IHC e ao FISH são os ensaios rotineiramente utilizados e validados na prática clínica para testar a presença de HER2 em situações de cancro da mama invasivo. Um teste IHC positivo é definido por uma coloração circunferencial forte membranar em  $> 10\%$  das células tumorais (A), enquanto um resultado negativo é definido por um valor inferior, com fraca coloração, incompleta ou mesmo ausente. Um resultado FISH positivo é definido por um rácio entre o gene do HER e o cromossoma 17  $> 2.2$  (B), enquanto um resultado negativo é definido por um valor  $< 1.8$  [15].

Esta revisão será orientada para o caso particular do cancro da mama triplo negativo, onde serão discutidos a epidemiologia, fatores de risco, manifestações clínicas, biopatologia, variáveis prognósticas e, sobretudo, a identificação dos diferentes subtipos que se inserem no espectro do TNBC, bem como as abordagens terapêuticas atuais e estratégias futuras, mais dirigidas, em desenvolvimento no panorama científico.

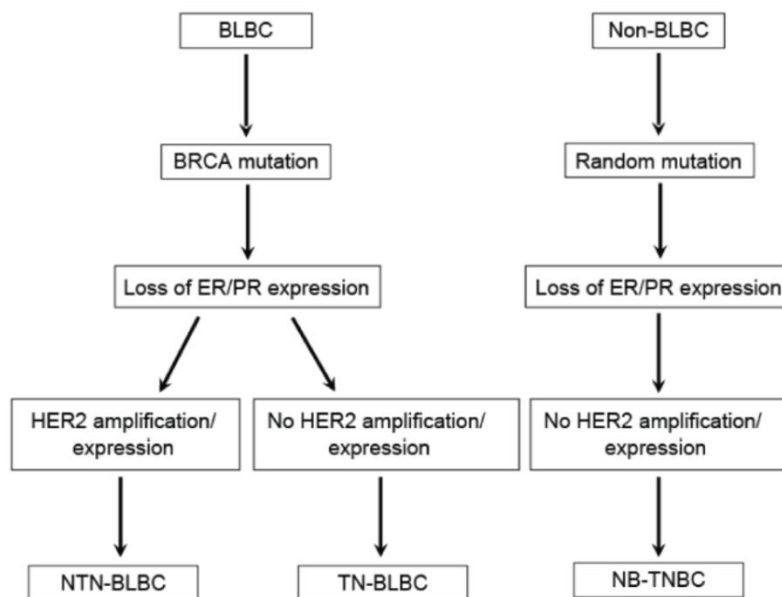
## Métodos

Os dados contemplados nesta revisão foram obtidos pela leitura e análise sistemática de literatura científica e artigos publicados em revistas médicas, recorrendo ao motor de busca PubMed de acesso à base de dados da MEDLINE, da Biblioteca Nacional de Medicina do Estados Unidos da América e Instituto Nacional da Saúde, utilizando os termos “triple negative”, “breast cancer”, “therapeutics” e/ou “therapies”, selecionando os artigos que mais se destacaram pela atualidade e relevância para esta tese de revisão, recorrendo ainda a conteúdo, normas e diretrizes disponíveis no portal da Direção Geral de Saúde e Organização Mundial de Saúde.

## Discussão

### Generalidades e Epidemiologia dos TNBC

O TNBC é responsável por cerca de 20% dos câncros da mama invasivos e o seu espectro molecular engloba alguns dos subtipos de cancro da mama supracitados: tumores tipo basal (que correspondem a cerca de 15% do total dos câncros da mama e a 50-85% dos TNBC; atentar que apenas 70% dos tumores do tipo basal, aqueles que não expressam HER2, se categorizam como TNBC – ver Figura 4), tumores do tipo mamário normal (6-10% do total dos câncros da mama) e os mais recentemente reconhecidos tumores com baixos níveis moleculares de claudina (5-10% do total dos câncros da mama; com características de células estaminais). Inclui ainda um subgrupo geneticamente particular, os tumores da mama que apresentam deficiência na expressão do BRCA-1, com um fenótipo de TNBC singular que será abordado com maior detalhe adiante. [6,7,10-12,16-19].



**Figura 4.** Origem do cancro da mama triplo negativo: Os tumores do tipo basal (BLBC) podem-se enquadrar como cancro da mama triplo negativo (TN-BLBC) ou, em caso de expressão de HER2, categorizam-se como cancro da mama do tipo basal não triplo negativo (NTN-BLBC); muitos estudos confundem estes dois subtipos diferentes, resultando em conclusões enviesadas. Outros câncros fora do espectro do tipo basal (Non-BLBC), como os do tipo mamário normal e os tumores com baixos níveis moleculares de claudina, que não expressam recetores de estrogénio (ER), recetores de progesterona (PR) e HER2, são classificados como câncros triplo negativos do tipo não basal (NB-TNBC). [20]

O TNBC surge muitas vezes como um “cancro de intervalo” (interregno entre duas mamografias). Assume um fenótipo de alta agressividade, com pior prognóstico que os tumores luminais [7,12,21]. Com frequência, ocorre fraca associação entre tamanho do tumor primário e número de metástases, com possibilidades mais altas de metastizar para o sistema nervoso central do que os restantes subtipos. Apesar da resposta terapêutica heterogênea, tem tendencialmente alta quimio-sensibilidade[22]. O TNBC apresenta também maiores taxas de recidiva durante os primeiros três anos após o diagnóstico e menor probabilidade de sobrevivência aquando da ocorrência de um evento metastático, comparativamente com todos os outros subtipos.

## **Fatores de Risco**

Dos fatores de risco associados ao desenvolvimento do TNBC, destacam-se:

a) Mutações BRCA – Doentes com síndromes cancerígenas da mama e ovário têm 50-85% de probabilidade de desenvolver cancro da mama durante a sua vida, sendo que até 20% dos doentes com TNBC apresentam mutações nestes genes, particularmente em BRCA1, cujas proteínas têm um papel preponderante no controlo de erros e reparação durante a replicação e recombinação homóloga do DNA [23-25]. O seu papel é importante na reparação do gene supressor tumoral PTEN e a sua disfunção contribui para o desenvolvimento do cancro e progressão metastática [26]. Nem todos os tumores da mama com disfunções genéticas ao nível do BRCA1 originam um TNBC, no entanto cerca de 60-80% dos tumores da mama com tais mutações apresentam fenótipo de TNBC do tipo basal, caracteristicamente tumores de alto grau, que surgem em idades mais precoces e, com frequência, em doentes com historial de cancro da mama familiar. Tais particularidades fundamentam o termo “BRCAness”, cada vez mais associado ao TNBC na literatura. [24,27-29]. Neste contexto, a todas as doentes com TNBC deve ser proposta a possibilidade de aconselhamento genético [30].

b) Idade – O TNBC é mais comum ser diagnosticado em mulheres com idade inferior a 40 anos, comparativamente com os cancros da mama hormono-dependentes. A evidência aponta para que ocorra cerca de duas vezes mais em idades <40 anos, do que em idades >50 anos [31], com a maior taxa de diagnósticos a incidir em mulheres em situação de pré-menopausa [32,33].

c) Raça – Vários estudos concluíram que mulheres africanas e de raça negra têm uma maior taxa de incidência deste subtipo de cancro [32,34].

d) Fatores Gestacionais/Maternidade – Tem-se constatado que a nuliparidade se correlaciona com um menor risco de desenvolver TNBC [35], enquanto mulheres com três ou mais filhos constituem uma população com um maior risco de desenvolver este subtipo de cancro da mama [36]. Relativamente à idade precoce da primeira gravidez [31,35], menarca em idade precoce, utilização de terapia hormonal de substituição e contraceptivos orais poderão influenciar um aumento de risco para o TNBC, mas a evidência não foi suficientemente significativa ao demonstrar uma correlação direta, estando estes fatores mais associados a tumores com positividade para recetores hormonais [37]. Relativamente a um período de amamentação mais prolongado, os estudos também divergem, havendo alguns que apontam para uma redução no risco de TNBC. [32]

e) Obesidade – Tendo como parâmetro um Índice de Massa Corporal  $\geq 30$ , a obesidade evidenciou-se como um fator de risco aumentado para o desenvolvimento de TNBC, significativamente superior para mulheres em pré-menopausa, mas sem correlação significativa em mulheres pós-menopausa [38].

f) O tabagismo não foi associado ao aumento da incidência do TNBC [39].

## **Apresentação Clínica**

Com frequência, o TNBC surge numa idade em que a maioria da população feminina ainda não iniciou o protocolo imagiológico de rastreio para o cancro da mama, uma vez que em Portugal, de acordo com as normas da Direção Geral da Saúde, mulheres com idade  $< 50$  anos e sem risco expectável aumentado para desenvolver cancro da mama, a mamografia de rastreio não está indicada. Mesmo em mulheres submetidas regularmente a técnicas imagiológicas de rastreio, o TNBC usualmente surge como um “cancro de intervalo” e, na maioria dos casos, como um tumor palpável [40,41].

A semiologia clássica da lesão é descrita como uma massa dura, imóvel, com bordos irregulares.

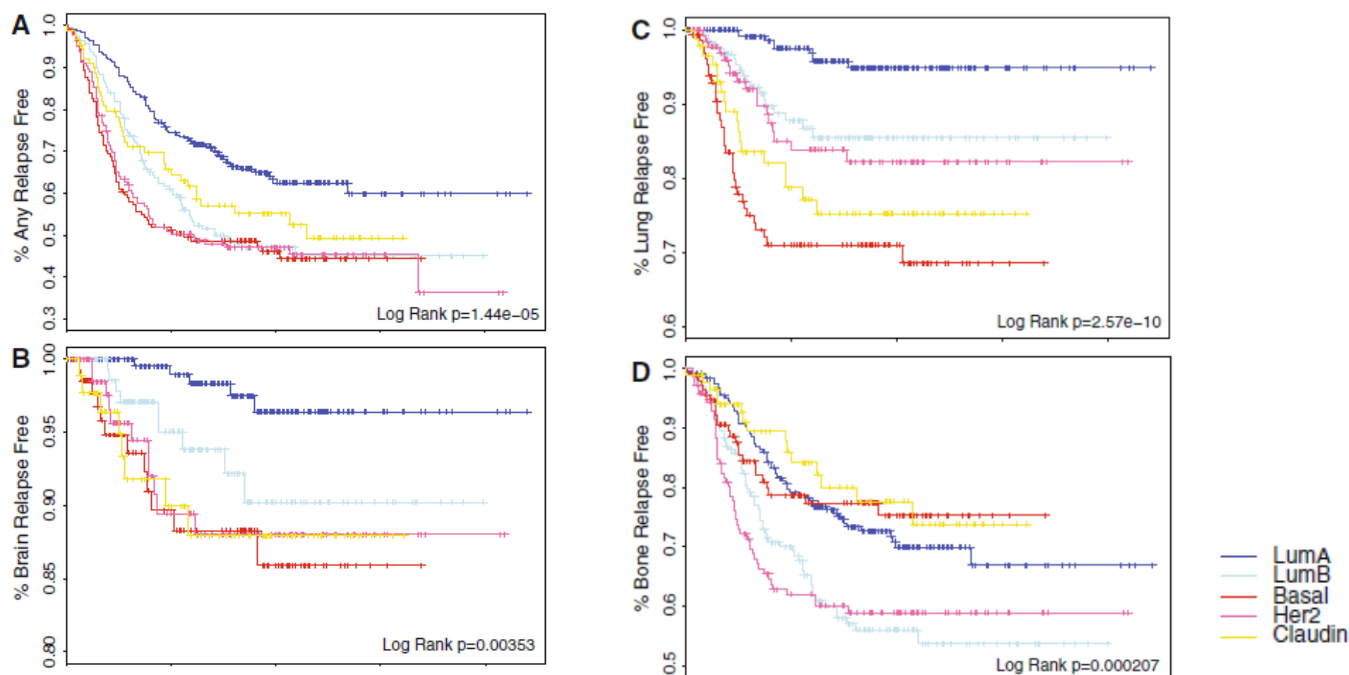
Os sinais de doença mais avançada locoregionalmente incluem a palpação de adenopatias axilares, eritema, espessamento cutâneo, pele rugosa “em casca de laranja”, inversão mamilar, e galactorreia unilateral [15].

Contudo, tais características ao exame físico não têm acuidade suficiente para distinguir com elevado grau de certeza entre tumores malignos e benignos, sendo a avaliação imagiológica e histológica importantes no decurso da marcha diagnóstica.

## **Padrão de Metastização**

Em termos gerais, a sobrevivência a 5 anos para o cancro da mama é de 98% para doença localizada, 84% para doença regional e apenas 23% para doença metastizada à distância. Em cerca de um quarto das doentes com cancro da mama em estadio inicial ocorrerá recidiva e o mesmo acontecerá em metade daquelas que se apresentarem com envolvimento ganglionar linfático axilar. [3]

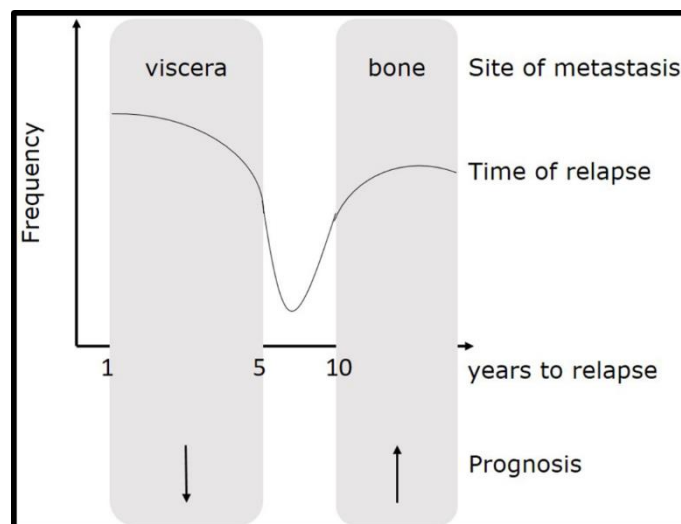
Existe fraca associação entre tamanho do tumor e o número de metástases ganglionares nos TNBC, que em vez de recorrer à via linfática para metastizar, segue preferencialmente uma via hematogénea para o sistema nervoso central (15-30% dos casos), pulmões, fígado, ao contrário do cancro da mama não triplo negativo, que metastiza pela via linfática preferencialmente para o osso, o que contribui para uma taxa de sobrevivência diminuída nos TNBC relativamente aos restantes subtipos [15,20,42,43,44] – Ver Figura 5.



**Figura 5.** Neste estudo, atentando no caso particular dos tumores do tipo Basal (que em grande parte representam o comportamento dos TNBC), constatou-se que o seu padrão de recidiva difere em comparação com os do tipo Luminal, hormonalmente positivos: A – Tipo Basal a demonstrar globalmente e independentemente da localização menores taxas de tempo livre de recidiva; B – Tipo Basal a demonstrar menores taxas de tempo livre de recidiva Cerebral; C – Tipo Basal a demonstrar menores taxas de tempo livre de recidiva Pulmonar; D – Tipo Basal a demonstrar maiores taxas de tempo livre de recidiva Óssea, local metastático mais característico dos tumores do tipo Luminal, hormonalmente positivos [44].

## Padrão de Recidiva

As taxas de recidiva dos TNBC são altas comparativamente com os outros subtipos de cancro da mama, com tendência para coincidir com terceiro ano pós-cirurgia. Ainda assim, o TNBC exibe um padrão de recidiva que aparenta ter dois picos de distribuição, o primeiro com uma alta taxa de recorrência precoce durante os cinco anos iniciais (doença mais agressiva e de prognóstico mais reservado), o segundo, de recorrência tardia passados 10 anos (associado a metástases ósseas e com melhor prognóstico), menos frequente e que em muitos casos corresponde a falsos negativos de cancros hormonalmente positivos [3] – Ver Figura 6.



**Figura 6.** Heterogeneidade na história natural do TNBC. As metástases desenvolvem-se preferencialmente nas vísceras em doentes com recidivas mais precoces, conduzindo a um mau prognóstico. Por outro lado, doentes com recidivas tardias apresentam-se com TNBC a evidenciar tendência para o desenvolvimento de metástases ósseas, com melhor prognóstico [3].

Os TNBC apresentam também menor probabilidade de recidiva locorregional antes de recidiva à distância (25% dos TNBC comparativamente com 44% dos outros subtipos de cancro da mama). Perante este cenário o prognóstico complica-se, tendo em consideração que a taxa de sobrevivência após recidiva é baixa, caracterizando-se por uma rápida progressão até à morte nos primeiros 5 anos. Nos anos subsequentes o risco decresce rapidamente, tanto que a grande maioria das mulheres com TNBC já não recidivará passados 8 anos sem progressão da doença, contrastando com os tumores hormonalmente positivos em que mais de 50% recidiva entre os 5 a 10 anos pós-cirurgia. [3,12, 41, 42].

## Características Imagiológicas

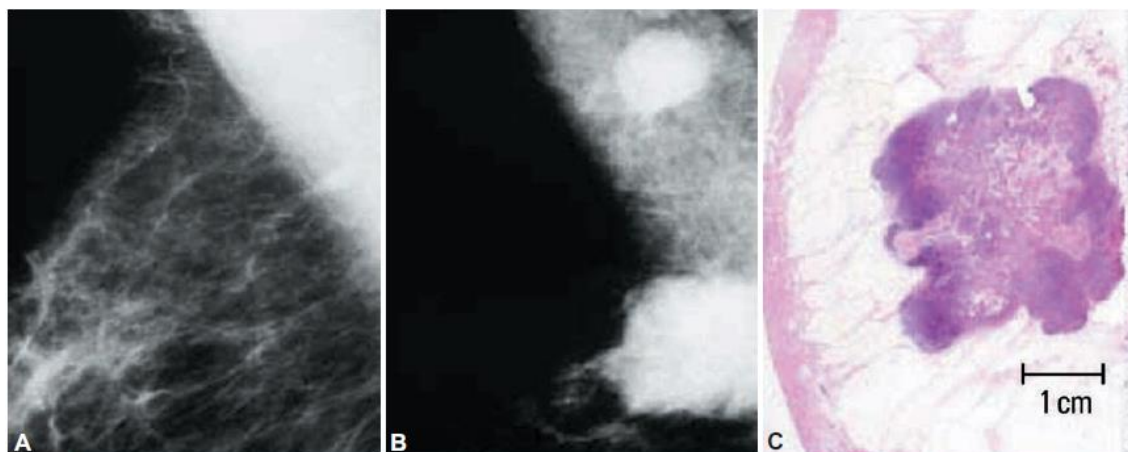
A mamografia é o método imagiológico na base da deteção e rastreio de cancro da mama em mulheres com idades > 40 anos. O cancro da mama invasivo manifesta-se tipicamente como uma massa espiculada ou mal definida, com ou sem calcificações associadas, possível distorção arquitetónica e densidade mamária assimétrica [15] – Ver Figuras 7 e 8.

O ultrassom (ecografia mamária) é frequentemente realizado para complementar o estudo mamográfico, útil para uma descrição mais detalhada do tamanho e extensão das lesões, particularmente vantajoso nos casos de mamas com maior densidade, típico em mulheres mais jovens (e característico nos TNBC), o que

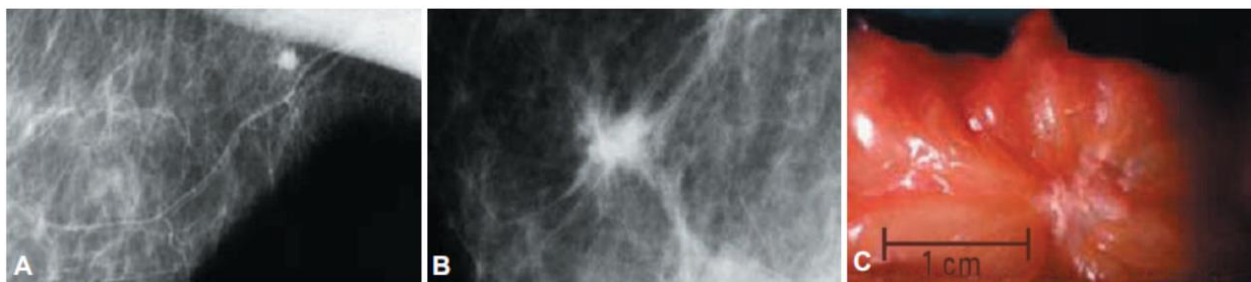


contribui para uma dificuldade acrescida no diagnóstico mamográfico precoce [45]. Continua a ser o método de eleição para avaliação imagiológica mamária em mulheres com idade <40 anos, podendo ser adicionalmente utilizado para facilitar a colheita de amostras ecoguiadas de massas e/ou adenopatias para análise histológica [15].

Neste sentido, em comparação com o ultrassom, a mamografia raramente é útil na avaliação de mulheres com idade <40 anos, ficando reservada a casos com alterações estruturais suspeitas e em casos de cancro da mama comprovado [40].



**Figura 7.** Demonstração mamográfica da evolução de um carcinoma invasivo da mama de nenhum tipo específico (NST) pouco diferenciado, exibindo-se como uma massa tumoral circular na mamografia. A- Densidade inespecífica na cauda axilar da mama direita. B- Passados 18 meses: massa tumoral lobulada, de alta densidade, contornos mal definidos, com >30mm é evidenciada na mamografia, aparentando ser maligna, com adenopatias detetáveis na região axilar. C- Secção histológica ampla do tumor [15].



**Figura 8.** A- Mamografia de carcinoma invasivo da mama, clinicamente oculto e com < 1 cm. B- Mamografia mais detalhada de carcinoma invasivo da mama, não palpável e com < 1 cm. C- Imagem mostrando as características macroscópicas da peça excisada [15].

A ressonância magnética é o método imagiológico mais sensível, mas permanece confinado ao rastreio de mulheres de alto risco (com mutações nos genes BRCA, por exemplo) e estadiamento em situações em que os restantes meios complementares não foram suficientemente esclarecedores [15].

No que concerne especificamente ao TNBC, este apresenta achados mamográficos distintos dos tumores HER2 e hormonalmente positivos. Apesar do seu maior tamanho à data do diagnóstico, até 18% dos TNBC são ocultos na mamografia inicial [46-48], podendo inclusivamente apresentar-se como uma massa de margens bem definidas em 20-24% dos casos e com ausência de calcificações em 49-100% dos casos, carecendo por vezes dos achados típicos de suspeição de doença maligna [46,48,49].

Relativamente ao ultrassom, o TNBC surge como uma massa bem circunscrita em 21-41% dos casos, com reforço da sombra acústica posterior em 24-41% dos casos [47-49], achados mais típicos de lesões benignas, como quistos e abscessos. Ainda assim, o reforço da sombra acústica é um achado que também pode indicar uma componente fluida interna, presente na necrose tumoral, uma característica frequentemente associada aos TNBC [50].

## **Estadiamento**

Na abordagem clínica inicial ao cancro da mama torna-se determinante recorrer a uma avaliação sistemática para que seja proposta uma opção terapêutica orientada para cada caso, baseada fundamentalmente em três determinantes prognósticos: o grau histológico, o tamanho tumoral e o status adenopático [51].

O TNM é o sistema de estadiamento mais utilizado à escala mundial para carcinoma da mama, engloba informação referente ao tamanho do Tumor primário (“T”), número de Gânglios linfáticos adenopáticos regionais (“N”) e Metástases à distância (“M”). T, N, e M combinados podem constituir cinco estadios (0, I, II, III e IV), que sumarizam a informação sobre a extensão regional (tamanho do tumor, invasão de estruturas torácicas e pele, envolvimento ganglionar) e da extensão da doença à distância, facilitando a decisão terapêutica adequada. Aplicam-se tanto o estadiamento clínico (dependente da examinação física e imagiológica), como o estadiamento biopatológico (com base na avaliação macro e microscópica dos tecidos excisados cirurgicamente). Foram ainda estabelecidas classificações yT e yN, que permitem avaliar os casos submetidos a terapêutica neoadjuvante, determinado após cirurgia definitiva, que possibilita a comparação entre o status pré e pós-tratamento, inferindo conclusões no que concerne ao prognóstico da doença. Há ainda que considerar a história natural da doença, que difere entre os distintos subtipos. Tomando como

exemplo o caso dos TNBC, que alternativamente à via de disseminação linfática mais comum nos outros subtipos, metastizam com mais frequência por via hematogénea, não sendo incomum que surjam metástases à distância sem que haja adenopatias locorreionais detetáveis [15] - Ver Anexos I e II.

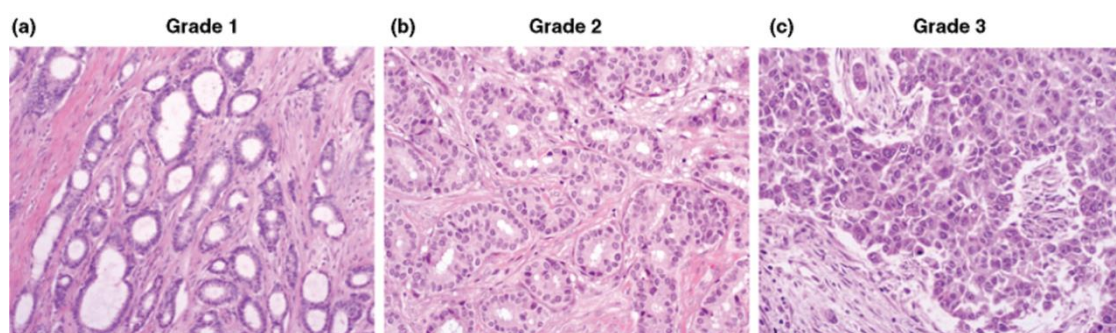
O grau histológico dos carcinomas da mama é categorizado de acordo com uma análise semi-quantitativa e morfológica, tendo por base o padrão de crescimento e de diferenciação celular, que refletem o grau de semelhança com as células do epitélio do tecido mamário normal. É um estudo relativamente simples e que acarreta baixos custos, requerendo uma preparação de amostra tumoral com a coloração hematoxilina-eosina e avaliação dos critérios do Sistema de Gradação de Nottingham, como convencionado pela Organização Mundial de Saúde e pelo Royal College de Patologia: (a) grau de formação tubular como forma de expressão de diferenciação glandular; (b) pleomorfismo nuclear; (c) contagem mitótica. Utiliza-se um sistema numérico de 1 a 3 para cada um dos fatores escrutinados individualmente, cuja soma corresponderá: 3–5 pontos: Grau 1, bem diferenciado; 6–7 pontos: Grau 2, moderadamente diferenciado; 8–9 pontos: Grau 3, pouco diferenciado [15,51] – Ver Figuras 9 e 10.

Feature	Score
<b>Tubule and gland formation</b>	
Majority of tumour (> 75%)	1
Moderate degree (10–75%)	2
Little or none (< 10%)	3
<b>Nuclear pleomorphism</b>	
Small, regular uniform cells	1
Moderate increase in size and variability	2
Marked variation	3
<b>Mitotic counts</b>	
Dependent on microscope field area	1–3
<b>Final grading</b>	
Add scores for gland formation, nuclear pleomorphism and mitotic count:	
Grade 1	Total score, 3–5
Grade 2	Total score, 6 or 7
Grade 3	Total score, 8 or 9

Field diameter (mm)	Mitotic count (score)		
	1	2	3
0.40	≤ 4	5–9	≥ 10
0.41	≤ 4	5–9	≥ 10
0.42	≤ 5	6–10	≥ 11
0.43	≤ 5	6–10	≥ 11
0.44	≤ 5	6–11	≥ 12
0.45	≤ 5	6–11	≥ 12
0.46	≤ 6	7–12	≥ 13
0.47	≤ 6	7–12	≥ 13
0.48	≤ 6	7–13	≥ 14
0.49	≤ 6	7–13	≥ 14
0.50	≤ 7	8–14	≥ 15
0.51	≤ 7	8–14	≥ 15
0.52	≤ 7	8–15	≥ 16
0.53	≤ 8	9–16	≥ 17
0.54	≤ 8	9–16	≥ 17
0.55	≤ 8	9–17	≥ 18
0.56	≤ 8	9–17	≥ 18
0.57	≤ 9	10–18	≥ 19
0.58	≤ 9	10–19	≥ 20
0.59	≤ 9	10–19	≥ 20
0.60	≤ 10	11–20	≥ 21
0.61	≤ 10	11–21	≥ 22
0.62	≤ 11	12–22	≥ 23
0.63	≤ 11	12–22	≥ 23
0.64	≤ 11	12–23	≥ 24
0.65	≤ 12	13–24	≥ 25
0.66	≤ 12	13–24	≥ 25
0.67	≤ 12	13–25	≥ 26
0.68	≤ 13	14–26	≥ 27
0.69	≤ 13	14–27	≥ 28

**Figura 9.** À esquerda o método semi-quantitativo utilizado para estabelecer o grau histológico dos tumores da mama. À direita, o score usado para definir o grau de contagem mitótica [15].

Variados estudos evidenciaram uma franca associação entre o grau histológico e a sobrevivência das doentes com carcinoma da mama invasivo, permitindo de certa forma uma avaliação suplementar prognóstica. Está demonstrado que um tumor em estadio II com grau 1 histológico, tem a mesma taxa de sobrevivência que aqueles em estadio I e grau histológico 3. Verificou-se também que tumores com grau 1 e < 2cm têm um excelente prognóstico, com 99% de taxa de sobrevivência em 5 anos, mesmo que se apresentem com gânglios linfáticos positivos. Deste modo, torna-se evidente que uma avaliação histológica adequada, em conjunto com a classificação TMN, tem um papel importante na previsão e discriminação do *outcome* da doença [51].



**Figura 10.** Grau histológico do cancro da mama estabelecido através do Sistema de Nottingham. (a) Tumor bem diferenciado (grau 1), que evidencia elevada homologia com o tecido normal mamário da unidade lobular ductal terminal, com formação tubular (>75%), com grau médio de pleomorfismo nuclear e baixa contagem mitótica. (b) Tumor moderadamente diferenciado (grau 2). (c) Tumor mal diferenciado (grau 3) com marcado grau de pleomorfismo celular, contagem mitótica elevada e parca formação tubular (<10%) [51].

## Classificação Molecular

Com base na classificação de Lehmann, segundo a expressão de microarrays de DNA, os TNBC podem ser divididos em seis diferentes subclasses, de acordo com o seu padrão molecular: tipo basal 1 e 2 (BL1 e BL2), imunomodelador (IM), mesenquimal (M), mesenquimal tipo estaminal (MSL) e luminal com recetor de androgénio (LAR). As primeiras duas subclasses têm um fenótipo do tipo basal, altamente proliferativo, com maior expressão dos genes relativos à proliferação e reparação do DNA, muitas vezes associados a mutações BRCA, tendo o BL2 a característica particular do aumento marcado ao nível da sinalização dos fatores de crescimento celular. A subclasse IM apresenta uma elevada sinalização celular e de imunocitoquinas. As subclasses M e MLS exibem uma expressão genética aumentada

para eventos de transição epitélio-mesenquima, motilidade celular e diferenciação; adicionalmente, os MLS têm níveis genéticos mais baixos de proliferação celular e expressão genética aumentada relacionada com células estaminais. Por último, a subclasse LAR apresenta níveis aumentados de recetor de androgénio (AR), com sensibilidade para antagonistas do AR, e padrão genético de expressão luminal. Dentro destas subclasses, a resposta à terapêutica convencional difere, bem como as taxas de recorrência e aparecimento de metástases [3,52].

De qualquer modo, análises genómicas têm indicado que estes subtipos podem coexistir dentro do mesmo tumor [53].

Neste âmbito, alguns estudos com amostras de pequena dimensão sucederam ao utilizar as diferentes subclasses como preditores independentes da evolução da doença, concluindo que: tanto a subclasse LAR como a M apresentam menores taxas de tempo livre de recidiva que BL1 e IM [54]; BL1 tem a taxa de resposta patológica completa (pCR – definida como ausência de doença residual, tanto na mama como axila) mais alta (52%), em contraste com BL2 (0%) e LAR (10%) que apresentam mais baixas, após terapêutica sistémica neoadjuvante; apesar da baixa taxa de pCR, a subclasse LAR tem a melhor taxa de sobrevivência global [55].

O que se destaca neste modelo de subclassificação e nos diferentes estudos conduzidos nesta área é o facto de que as características particulares dos TNBC vão afetar não só o curso clínico natural da doença, como também a taxa de resposta às diferentes terapêuticas disponíveis e outras em desenvolvimento em ensaios clínicos, permitindo uma possível diferenciação entre subclasses com probabilidade de recidiva distintas e discriminação futura entre as abordagens dirigidas ao padrão molecular, dentro do espectro heterogéneo do TNBC [3,20].

## Biopatologia

A nível histológico, os TNBC tendencialmente evidenciam características desfavoráveis, apresentando-se como tumores de alto grau, elevada heterogeneidade intratumoral, com crescimento rápido, agressivo e grandes dimensões à data do diagnóstico [41,56,57].

Cerca de 90-95% são unifocais e classificados como carcinomas invasivos de nenhum tipo específico (NST, também denominados simplesmente por carcinomas ductais invasivos, nalgumas referências) [15,20], associados a pior prognóstico.

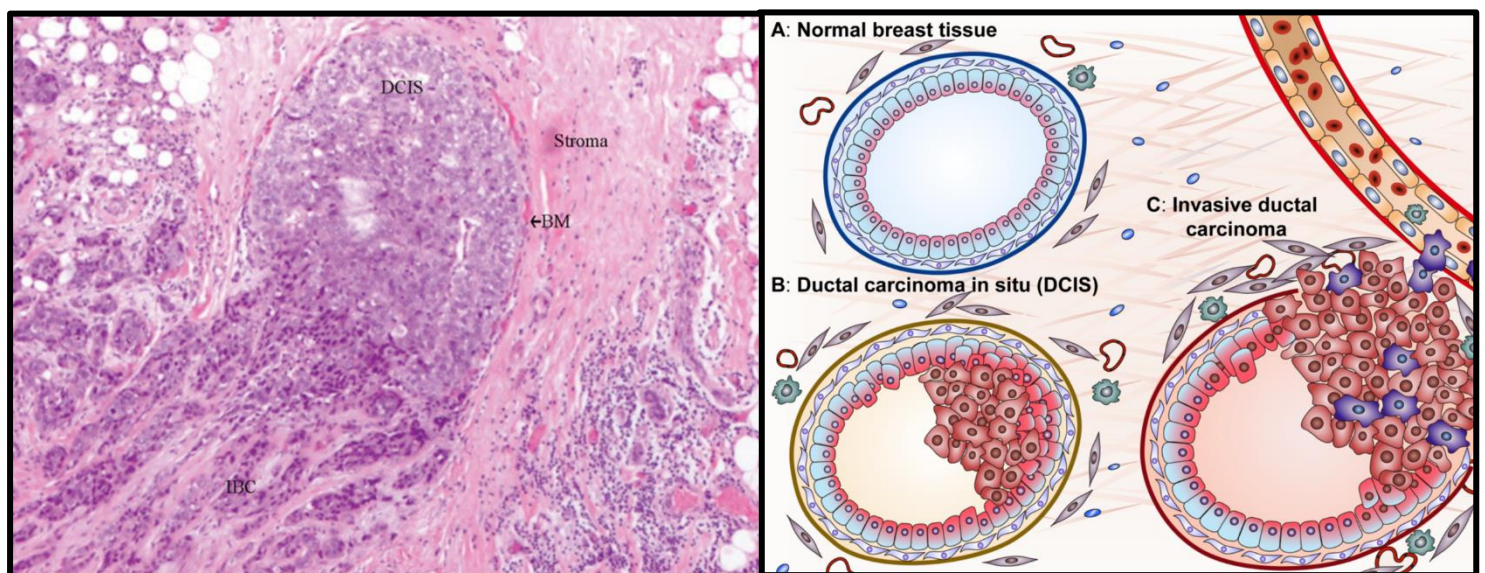
A nível macroscópico estes tumores não apresentam características específicas. Existe marcada variabilidade em termos de dimensões, normalmente entre 10 a 100 mm. Usualmente os contornos são moderadamente ou mal definidos, com consistência firme e dura à palpação, evidenciando uma sensação arenosa ao corte e aparência cinzento-claro com algumas estrias amareladas [15] – Figura 11.



**Figura 11.** Peça de mastectomia originária de uma doente com carcinoma invasivo de nenhum tipo específico [15].



A nível histológico não apresentam características histopatológicas distintivas, o seu reconhecimento é feito por um processo de exclusão dos outros tipos de tumor específicos menos frequentes, com morfologia que varia consideravelmente de caso para caso [58]. Arquitetonicamente as células tumorais podem-se apresentar em cordões, aglomerados (clusters) ou em disposição trabecular. O citoplasma pode ser abundante e eosinofílico, com os núcleos a variar desde regulares e uniformes, até altamente pleomórficos com múltiplos e proeminentes nucléolos. [15] Até 80% dos casos existem evidências da presença de carcinoma ductal *in situ* associado (DCIS – definido como proliferação de células malignas epiteliais dentro do sistema ductal mamário, sem evidência de invasão do estroma que o rodeia), usualmente com o mesmo grau nuclear que o carcinoma invasivo – Figura 12. [15,51,59]

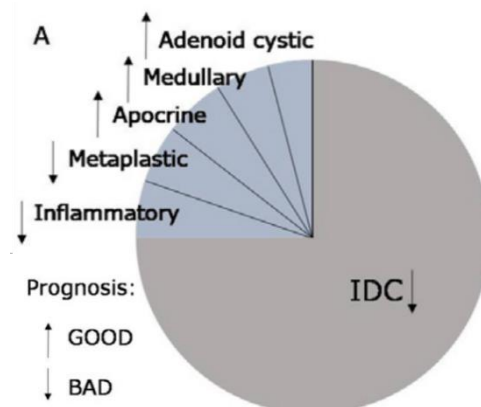


**Figura 12.** À esquerda, visível a componente invasiva originada diretamente a partir de um DCIS (Hematoxilina, ampliação original  $\times 200$ ). À direita, uma representação esquemática. DCIS, carcinoma ductal *in situ*; IBC, cancro da mama invasivo; BM, membrana basal [59,60].

Conforme já mencionado, os carcinomas da mama podem ser divididos em três graus histológicos pelos critérios do Sistema de Gradação de Nottingham em: bem diferenciados (grau 1), moderadamente diferenciados (grau 2) e pouco diferenciados (grau 3). Caracteristicamente, os pouco diferenciados tendem a ser mais resistentes à terapêutica sistémica e são associados a um pior prognóstico, comparativamente aos bem diferenciados. No caso particular dos TNBC, a maioria apresenta-se tipicamente em grau 3 e com padrões genéticos de mau prognóstico associados. [51, 15]

Com pouca frequência (<1%), os TNBC podem apresentar-se como carcinomas metaplásicos, normalmente de alto grau, pleomorfismo nuclear notável, com diferenciação escamosa e/ou mesenquimal, heterogeneidade tumoral, mau prognóstico e resistência à terapêutica [61]. Os tipos de TNBC associados a melhor prognóstico classificam-se como: carcinomas medulares (elevado grau, mas com elevada infiltração linfocítica conferindo bons *outcomes*, crescimento sincicial e bem circunscritos)[15,62,63], apócrinos (usualmente em doentes idosos e raramente a alcançar grau 3, muitas vezes AR positivos e da subclasse LAR) [64], lobulares pleomórficos, secretórios e adeno-quísticos (ambos de baixo grau) - cada um deles surgindo raramente, em <1% das situações [65,66]. Alguns casos, como os carcinomas adeno-quísticos, seguem mesmo um curso indolente [67] A Figura 13 sumariza e evidencia o prognóstico previsível para cada uma das subclasses de TNBC.

Histologicamente a subclasse IM tende a assemelhar-se com o cancro da mama medular, M e MSL com o cancro da mama metaplásico e a LAR com os tumores apócrinos [54]. Na Figura 14 estão indicadas as prevalências de cada subclasse e representadas histologicamente as subclasses mais raras. A Figura 15 apresenta as características histológicas de um TNBC da subclasse LAR, destacando expressão recetores de androgénio detetável por IHC.



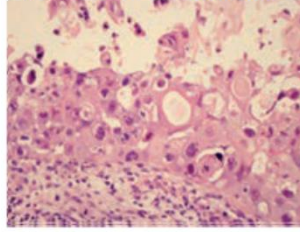
**Figura 13.** Heterogeneidade histológica e molecular do TNBC. A- A maioria dos TNBC classificam-se como carcinomas invasivos de nenhum tipo específico (carcinomas ductais invasivos - IDC), associados a um mau prognóstico. Das restantes subclasses de TNBC, também com mau prognóstico destacam-se os metaplásicos e os inflamatórios; com bom prognóstico, os adeno-quísticos, medulares e os apócrinos [3].



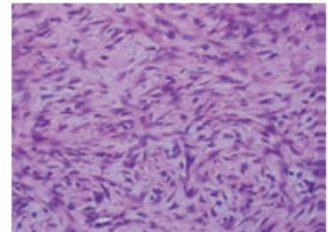
### Histological subtypes

- Invasive ductal carcinoma (95%)
- Invasive lobular carcinoma (1–2%)
- Metaplastic carcinoma with squamous differentiation (<1%)
- Spindle-cell metaplastic carcinoma (<1%)
- Adenoid cystic carcinoma (<1%)
- Secretory carcinoma (<1%)
- Typical medullary carcinoma (<1%)
- Atypical medullary carcinoma (<1%)
- Apocrine carcinoma (<1%)

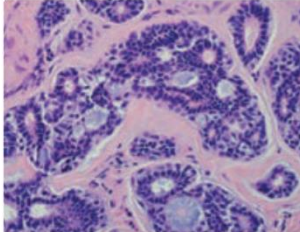
Metaplastic carcinoma with squamous differentiation



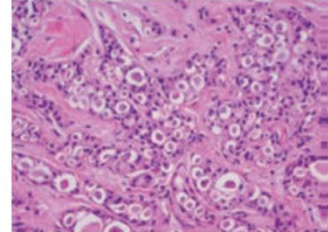
Spindle-cell metaplastic carcinoma



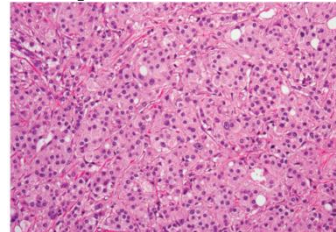
Adenoid cystic carcinoma



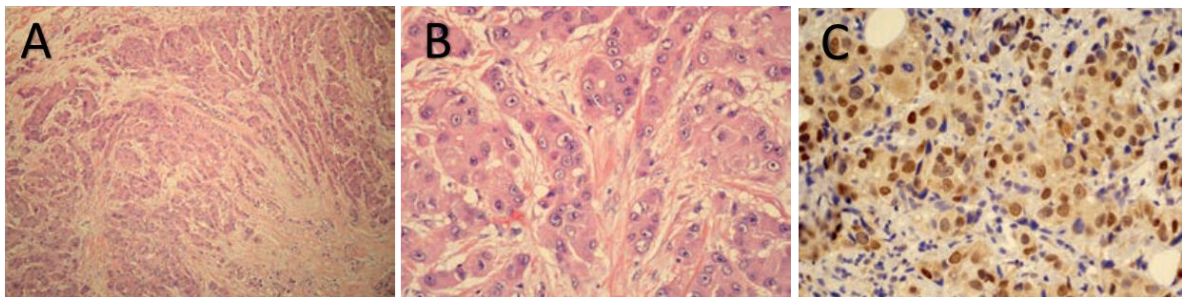
Secretory carcinoma



Apocrine carcinoma



**Figura 14.** Panorama heterogêneo de apresentação das diferentes subclasses de TNBC, diferentes padrões moleculares e distribuição – Representação histológica de algumas das subclasses mais raras [68,131].



**Figura 15.** Características histológicas de um TNBC com positividade para o recetor de androgénio luminal (LAR) A- Com baixa ampliação, observam-se nichos infiltrativos e cordões eosinofílicos de células tumorais rodeados por um estroma desmoplásico desprovido de linfócitos infiltrantes do tumor. B- Células tumorais a apresentarem núcleos alargados como nucléolos proeminentes e abundante citoplasma granular eosinofílico e, tal como descrito, baixa contagem mitótica como é frequente na subclasse LAR. C – Expressão nuclear dos recetores de androgénio detetável por IHC, característico da subclasse LAR [68].

## Fatores Prognósticos

Como já discutido, fatores como a etnia, idade de apresentação, IMC, biopatologia, estadios à apresentação e sensibilidade à quimioterapia influenciarão o prognóstico, tal como resumido na Figura 16.

Characteristics	Worse outcome	Better outcome
Age of presentation	Young	Old
Stage at presentation	Advanced	Early
Growth rate	Fast	Slow
First site of metastasis	Liver and brain	Lymph nodes and bone
Chemotherapy response	Resistant	Sensitive
Body mass index	High	Low
Ethnicity	African	Caucasian

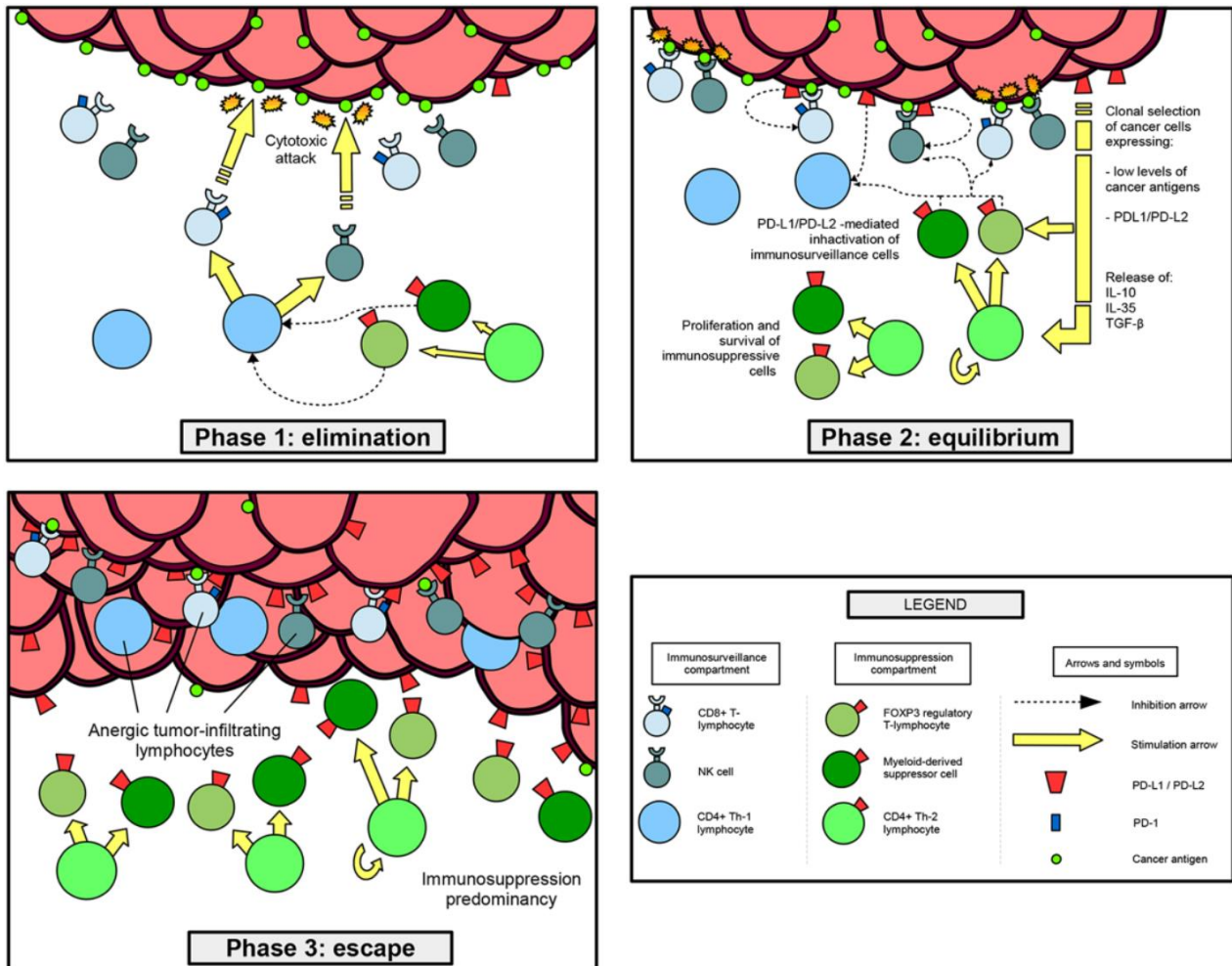
**Figura 16.** Correspondência dos diferentes *outcomes* expectáveis, face à heterogeneidade clínica, epidemiológica e terapêutica do TNBC [3].

Por outro lado, foi constatado que do ponto de vista genético existe uma expressão aumentada de Ki67 e p53 nos TNBC, quando comparado com os outros subtipos de cancro da mama, considerados fatores de mau prognóstico e associados ao aumento da taxa metastática [69].

Vários outros estudos demonstraram que a obtenção pCR após terapêutica neoadjuvante revela um bom prognóstico, especialmente no caso dos TNBC, sendo usado como marcador de resposta a longo prazo e sobrevivência [70].

Um novo paradigma prognóstico para os TNBC que tem vindo a ganhar destaque recentemente relaciona-se com a imunovigilância. Nos estadios iniciais da génese tumoral, tem-se verificado que alguns linfócitos (células T CD8+, células Th-1 de ajuda CD4+, células Natural Killer (NK)) evidenciam capacidade de reconhecer e eliminar células malignas, designados como linfócitos infiltrantes do tumor (TIL), combatendo ativamente a proliferação cancerígena nos estadios iniciais (fase de eliminação). As células tumorais são submetidas a um processo de seleção Darwiniana progressiva e através de sucessivas mutações, ocorre evolução para um fenótipo celular caracterizado pela redução dos antígenos de superfície reconhecíveis, sobreexpressão de moléculas que inibem diretamente a atividade linfocitária (como ligandos de morte celular programada 1 e 2 (PD-L1/PD-L2)) e promoção da atividade das células T reguladoras (FOXP3+) imunossupressoras, que permitem a evasão aos mecanismos

imunes de reconhecimento tumoral (fase de equilíbrio) e retoma da progressão da atividade clonal maligna (fase de escape) [71] – Figura 17.



**Figura 17.** Representação da teoria imunomodeladora: inicialmente, a imunovigilância por parte dos linfócitos T CD8+, T CD4+, e natural killer (NK), contrariam eficazmente a proliferação celular tumoral (fase de eliminação). Posteriormente, alguns clones celulares malignos, através de uma seleção Darwiniana que resulta na redução da expressão dos antígenos de superfície e aumento da expressão das moléculas de checkpoint imune PD-L1/PD-L2, conseguem escapar à ação linfocitária. Durante esta fase, a taxa de eliminação celular tumoral é equivalente à quantidade de células que conseguem contornar a ação imune (fase de equilíbrio). Por último, prevalece a proliferação deste tipo celular tumoral e aumentam os níveis de células T reguladoras (FOXP3+) imunossupressoras, tornando o mecanismo de imunovigilância praticamente anérgico (fase de escape). [71]

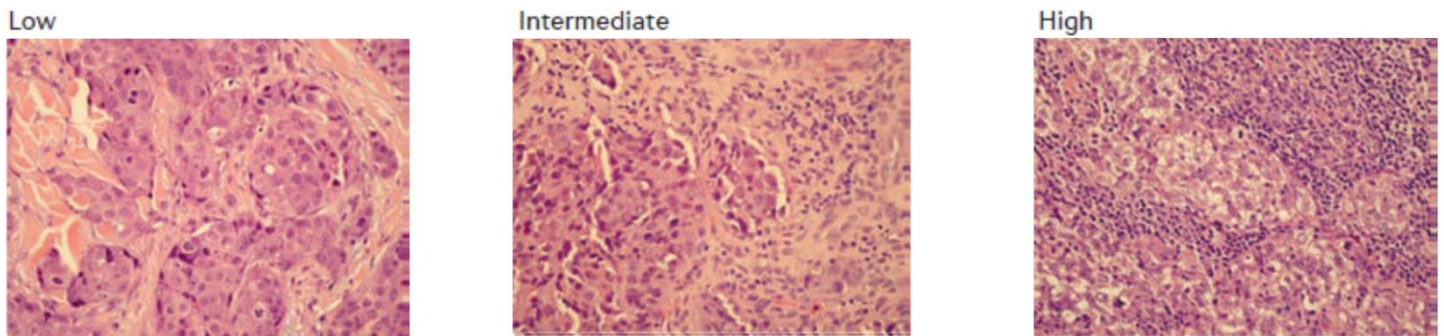
A presença de TILs surge como um reflexo de uma tentativa do hospedeiro erradicar a doença maligna e tem sido associada a um valor prognóstico positivo nos TNBC (subtipo de cancro da mama mais imunogénico que aqueles que apresentam positividade para os recetores hormonais), em que percentagens iniciais superiores de células T CD8+ apresentam melhores *outcomes* e taxas de sobrevivência mais elevadas, permitindo também inferir o sucesso subsequente da resposta terapêutica neoadjuvante e adjuvante pela análise da evolução da população linfocitária. Relativamente aos TNBC, a avaliação do rácio CD8+/FOXP3+ tem representado um parâmetro fiável, que fundamentalmente tem em conta o balanço entre imunovigilância e imunossupressão dentro do leito tumoral, estando os rácios mais elevados correlacionados com uma maior probabilidade de alcançar uma pCR nos TNBC submetidos a terapêutica neoadjuvante. A subclasse IM dos TNBC, que se caracteriza pela elevada expressão de genes da cascata de sinalização imune, tem sido associada à ativação linfocitária, apresentando uma taxa de sobrevivência livre de doença superior à das restantes subclasses [128].

A correlação entre o infiltrado linfocitário e o sucesso terapêutico aparenta sustentar-se no mecanismo sinérgico entre o aumento da expressão antigénica e libertação de moléculas imunogénicas (como CCL2/CCR2 e IL2) pela ação farmacológica anti-tumoral, e pelo subsequente aumento do recrutamento de células apresentadoras de antígeno e sensibilização das células tumorais à atividade linfocitária citotóxica, favorecendo desta forma a eficácia terapêutica. Em última análise, o tratamento anti-tumoral vê a sua eficácia aumentada pela sua própria atividade imunomoduladora, pelo que se tem considerado a presença de TILs na doença residual após tratamento como um fator prognóstico positivo, apresentando associação direta com melhores taxas de sobrevivência.

À data do diagnóstico, apenas aproximadamente 5–15% dos TNBC são classificados como predominantemente linfocitários (definido como > 60% de linfócitos no estroma), 15–20% dos TNBCs não apresentam infiltração linfocítica, enquanto os restantes 65–80% apresentam-se como leve a moderadamente linfocitários [130] – Figura 18. Alguns estudos apontaram que a cada aumento de 10% dos TILs no estroma, estaria associada uma redução de 15% no risco de mortalidade em doentes com TNBC, correlacionando-se também com menores taxas de recidiva. [130]



Contudo, apesar da determinação de TILs ter sustentação para se tornar num fator de prognóstico válido para os TNBC, ainda não é oficialmente recomendada por falta de procedimentos padronizados à escala global no que respeita ao isolamento, caracterização e individualização de critérios para os diferentes subtipos de cancro da mama. Todavia, poderá representar um parâmetro independente na avaliação de novas terapêuticas em ensaios clínicos. [71]



**Figura 18.** Heterogeneidade da presença de TILs, estando representados nas imagens tumores com leve, moderada e predominante infiltração linfocitária, respetivamente.

## **Tratamento do Cancro da Mama Triplo Negativo**

### **Cirurgia e Radioterapia**

O tratamento locoregional do TNBC é semelhante ao dos outros cancros da mama invasivos e a acomete excisão cirúrgica do tumor por mastectomia ou cirurgia conservadora da mama seguida por radioterapia (CMR). A cirurgia conservadora da mama continua preconizada como padrão para tumores de pequenas dimensões (T1 e T2), enquanto a mastectomia fica reservada para tumores maiores, mutações BRCA-1, multifocais e para aqueles que permanecem com margens positivas após CMR. De qualquer modo, mesmo TNBC com maiores dimensões podem alcançar boas taxas de pCR se submetidos a terapia neoadjuvante para redução do tamanho tumoral, permitindo a realização de CMR [70,73,74].

## Tratamento Sistêmico – Quimioterapia

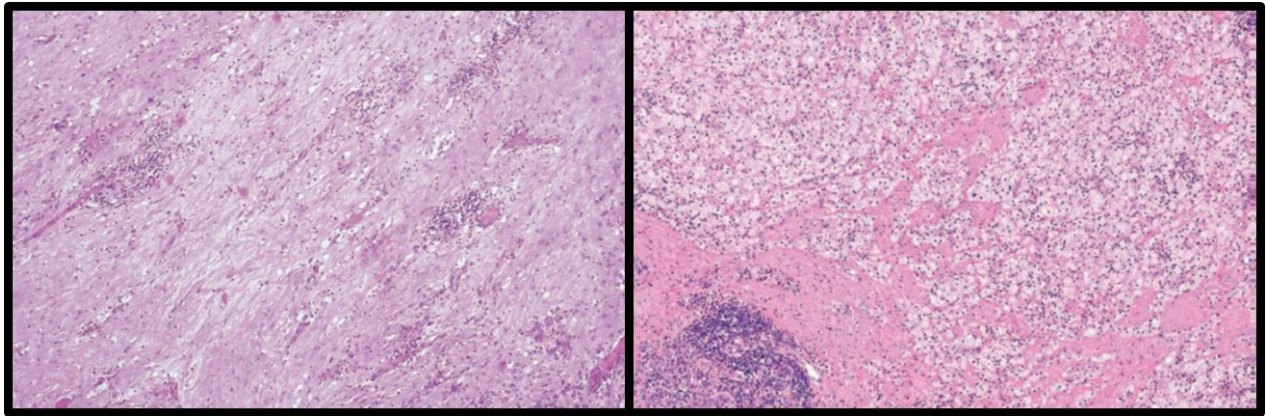
Atendendo à falta de alvos moleculares e terapêutica dirigida, o paradigma atual assenta na quimioterapia como o tratamento sistêmico aprovado. O TNBC caracteristicamente é um dos subtipos de cancro da mama com maior grau de quimio-sensibilidade [74,75,76]. Apresenta elevadas taxas de pCR após terapêutica neoadjuvante, superiores às obtidas nos cancros da mama não-TNBC [70], evidenciando uma resposta rápida à terapêutica logo após os primeiros dois ciclos [74]. A terapêutica adjuvante está preconizada para doentes com TNBC cujas dimensões tumorais sejam >0,5cm ou caso existam evidências de gânglios linfáticos afetados (independentemente do tamanho tumoral). Entre os esquemas de quimioterapia sistêmica aprovados para o cancro da mama, não existe nenhum específico para o fenótipo TNBC ou com maior grau de superioridade [74].

Os regimes padrão para o cancro da mama, quer como terapêutica neoadjuvante, quer como adjuvante, tipicamente incluem uma antraciclina (citostático, como a Doxorrubicina ou Epirubicina) mais um agente alquilante (citotóxico, como a Ciclofosfamida), sendo administrado concomitantemente ou subsequentemente um taxano (antimitótico, como Docetaxel ou Paclitaxel). Estes regimes evidenciam um aumento da taxa de sobrevivência, independentemente da expressão de RE [9,77] e constituem o padrão para o tratamento sistêmico do cancro da mama [78], demonstrando ser altamente ativo contra o TNBC [79], com taxas de resposta clínica até 85% e taxas de pCR entre 30–40% [80].

A utilização de TAC (Docetaxel /Doxorrubicina/ Ciclofosfamida) ou TAC-NX (TAC- Vinorelbina/Capecitabina) representam dos esquemas com maiores taxas de pCR obtidas em ensaios multicêntricos [81]. Ainda assim, mesmo apresentando uma elevada resposta à quimioterapia pré-operatória com elevadas taxas de pCR, mantém-se o subtipo de cancro da mama com maior taxa de recidiva, sendo este fenómeno designado por “paradoxo do triplo-negativo” [127].

Caso se atinja uma pCR com a instituição de quimioterapia, o prognóstico é substancialmente melhor. Nestas situações, a nível histológico apenas se identifica uma área de tecido conjuntivo laxo, edematoso e fibroelástico, com presença de elementos celulares inflamatórios crónicos e macrófagos na região do leito tumoral. Por vezes, existem pequenas regiões de células atípicas que se mantêm presentes e, nesse caso,

estudos imunohistoquímicos poderão ajudar a distinguir células tumorais de células histiocíticas benignas [15] – Figura 19.



**Figura 19.** Resposta patológica completa após terapêutica neoadjuvante. À esquerda, um exemplo com tecido conectivo edematoso abundante, baixa contagem celular e infiltrado celular inflamatório crônico presentes. À direita, células histiocíticas (benignas) acumuladas na localização do leito tumoral [15].

Existem estudos a decorrer no sentido de se apurarem regimes de quimioterapia neoadjuvante/adjuvante otimizados para o TNBC e novas combinações farmacológicas estão atualmente sob investigação para potenciar os *outcomes* do tratamento sistémico atual, como será discutido adiante [82].

## Quimioterapia em contexto de doença metastática

Apesar de poder ocorrer uma mudança no perfil de recetores entre tumor primário e lesão metastática, são poucos os casos em que se registou o aparecimento de RE, RP ou HER2 conferindo alternativas terapêuticas extra no caso dos TNBC [83]. Todavia, recomenda-se a repetição da avaliação do status dos recetores, tendo em consideração a possibilidade de um falso negativo na primeira análise. Estudos apontam para uma discordância de recetores na biopsia da metástase em 2 a cada 23 casos, em doentes diagnosticadas inicialmente com TNBC [83].

De qualquer forma, este cenário surge como pouco provável e a quimioterapia permanece como a base do tratamento sistémico em caso de recidiva, com o objetivo principal a passar pelo prolongamento da sobrevivência e palição sintomática, em que a resistência à ação farmacológica torna a progressão tumoral inexoravelmente rápida,

sendo o prognóstico pior quando comparado com os outros subtipos de cancro da mama[42]. Apesar de um esquema otimizado com quimioterapia sistêmica, menos de 30% das mulheres com doença neoplásica metastática da mama sobrevive mais de 5 anos após o diagnóstico e, no caso particular do TNBC metastático, virtualmente todas as mulheres evoluirão no sentido de uma morte precoce. [80]

Quimioterapia com agente único é preferível algumas vezes, no entanto opta-se por uma combinação sempre que a doente consiga tolerar e que seja necessária uma resposta imediata. As opções para terapêutica com agente único no TNBC incluem Antraciclina (Doxorubicina, Epirubicina), Taxanos (Paclitaxel, Docetaxel), anti-metabolitos (Capecitabina, Gemcitabina), inibidores dos microtúbulos (Vinorelbina, Ixabepilona, Eribulina) ou agentes platínicos (Cisplatina, Carboplatina - que são uma mais valia no caso particular do subgrupo com disfunções BRCA). Regimes de quimioterapia combinada com atividade em doentes pré-tratados com antraciclina incluem o Paclitaxel mais Gemcitabina e Docetaxel mais Capecitabina. No caso dos TNBC, Ixabepilona à Capecitabina mostrou melhorar a taxa de resposta em contexto de doença metastática [84].

## **O futuro da abordagem terapêutica**

A compreensão da fisiopatologia subjacente ao TNBC ao nível da genética, mecanismos de resistência, vias biológicas, cascatas de sinalização e padrões de expressão molecular tem fomentado o desenvolvimento novas terapêuticas alvo no sentido de no futuro poderem ser oferecidas mais alternativas àquelas disponíveis no paradigma atual. Neste contexto, serão abordados alguns dos fármacos promissores em estudo, o seu mecanismo de ação e os resultados obtidos até à data.

## **Agentes da família das Platinas**

Os TNBC associados a mutações BRCA-1, com defeito nos mecanismos de reparação do DNA, são especialmente sensíveis aos agentes anti-tumorais da família das Platinas, que se ligam ao DNA provocando ligações cruzadas entre a dupla cadeia, afetando a replicação, proporcionando deficiência no reparo que, em ultima análise, conduz à apoptose celular [78]. No caso dos TNBC com defeitos na expressão do BRCA, apenas utilizando Cisplatina como agente único em terapêutica neoadjuvante foram alcançados taxas de pCR na ordem dos 61% [85]. Outros estudos em doentes



com TNBC apresentaram taxas de pCR ligeiramente superiores com a combinação de agentes platínicos (caso da Carboplatina) à quimioterapia padrão [80].

Resultados apontaram ainda que as linhagens celulares das subclasses BL1 e BL2, com expressão aumentada dos genes do ciclo celular e de resposta ao dano no DNA, apresentaram-se mais sensíveis à cisplatina [129].

A incorporação destes agentes tem sido considerada em casos de doença localmente avançada, especialmente no subtipo TNBC com mutação BRCA, mas o seu uso permanece controverso dada a elevada toxicidade associada ao tratamento e falta de dados esclarecedores relativamente aos seus benefícios a longo prazo, não estando ainda contemplados nas guidelines internacionais como estratégia neoadjuvante ou adjuvante fora do contexto de ensaio clínico, podendo contudo oferecer uma opção terapêutica em contexto de doença metastática, onde os tratamentos são maioritariamente paliativos dada a escassez de alternativas [80].

## **Inibidores Poli-ADP-ribose polimerase (PARP)**

As PARPs incluem-se numa vasta família de enzimas multifuncionais, dentro da qual a PARP1 é a mais abundante. A PARP1 e a PARP2 encontram-se envolvidas no processo de reparação das cadeias de DNA pelo denominado restauro por excisão de bases, contribuindo ainda para estimulação dos estádios iniciais da replicação, proporcionando atividade reparadora durante a fase de recombinação homóloga. Os inibidores PARP, como o Iniparib e o Olaparib, exercem especialmente a sua atividade antitumoral em tumores com mutações nos genes de BRCA, que como é sabido constituem um subgrupo particularmente interessante dos TNBC. Nas células normais, uma eventual falha da ação das PARP perante uma quebra no DNA é compensada pela recombinação homóloga levada a cabo pelas proteínas BRCA funcionais [86]. A disfunção em células com mutação BRCA e a ação adicional da inibição da PARP funciona sinergicamente, originando uma instabilidade tal que, por um lado, conduz à morte celular por apoptose [78], por outro, aumenta a sensibilidade à quimioterapia. Não apresentam eficácia em TNBC sem mutações BRCA [87] e naqueles que apresentam este defeito, a monoterapia não aparenta ser suficiente. Os estudos iniciais pareceram encorajadores no espectro dos TNBC BRCAness, com alguns ensaios a evidenciarem um aumento nas taxas de sobrevivência livre de progressão de doença quando comparado com o tratamento padrão atual [88-90].

A combinação dos inibidores PARP, como o Olaparib, com a quimioterapia padrão tem se revelado uma abordagem terapêutica promissora no caso dos TNBC com mutações BRCA, originando taxas de resposta até cerca de 88% dos casos [88-90].

Apesar da aparente eficácia contra este subtipo específico de cancro, o principal desafio assenta em otimizar o regime terapêutico de forma a atenuar a toxicidade que algumas destas combinações ainda apresentam, na realização de ensaios robustos que comprovem o seu benefício significativo e na seleção adequada dos doentes que poderão beneficiar mais desta opção [91].

## **Recetores tirosina-cinase (RTK)**

Os alvos dos RTK no TNBC incluem o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e o recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR).

## **Inibidores do EGFR**

A expressão de EGFR, associada à génese tumoral, proliferação, transição epitélio-mesénquima e migração metastática, foi registada em até 89% dos casos de TNBC, surgindo como um alvo promissor, particularmente na subclasse BL2, que vê o seu fenótipo enriquecido com uma marcada presença deste recetor [92-94]. Contudo, os inibidores do EGFR, como Gefitinib, que evidenciaram potenciar os efeitos quimioterapêuticos dos fármacos padrão contra os TNBC em ensaios *in vitro*, não sucederam em demonstrar resultados significativos *in vivo* [95,96].

Mais recentemente tem havido uma aposta no desenvolvimento de conjugados fármaco-anticorpo, caso do Sacituzumab-Govitecan, que combinam a citotoxicidade farmacológica da quimioterapia, com a especificidade do anticorpo orientada para a Trop2 (proteína importante na regulação cascata de sinalização do EGFR), reduzindo os efeitos adversos da terapêutica não dirigida, com estudos fase II a evidenciarem respostas objetivas em 30% dos casos de TNBC, com menos toxicidade associada [97]. A possibilidade da sua introdução na prática clínica futura dependerá do desenvolvimento de um método de seleção otimizada dos candidatos mais apropriados, com base em biomarcadores, e de ensaios clínicos significativos com resultados esclarecedores que corroborem a sua eficácia.

## **Inibidores do fator de crescimento endotelial vascular**

O TNBC caracteriza-se por ser uma neoplasia altamente proliferativa e que necessita de constante angiogénese durante todas as fases do seu desenvolvimento. Existem cinco membros na família VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D e fator de crescimento placentário) e três recetores conhecidos (VEGFR1-3), com a atividade angiogénica a ser mediada sobretudo pela via do VEGFR2. A expressão de VEGF-A encontra-se mais elevada em TNBC que nos restantes subtipos de cancro da mama, fator associado a um pior prognóstico. [98]

Os inibidores do VEGF bloqueiam a neovascularização e, neste sentido, maioria dos ensaios em TNBC têm investigado a repercussão da adição do anticorpo anti-VEGFA, bevacizumab, à quimioterapia convencional. Apesar dos resultados iniciais apontarem para um aumento na taxa de pCR em doentes com cancro da mama metastático em vários ensaios de fase III [99,100], alguns dos estudos mais recentes não encontraram diferença significativa nas taxas de sobrevivência [101-103]. A escassez de evidência quanto à sua eficácia e a preocupação quanto à toxicidade estão na base da desaprovação desta classe farmacológica para o tratamento do TNBC [104], encontrando-se em decurso ensaios clínicos com esquemas de Bevacizumab, e outros agentes anti-angiogénicos promissores como o Sunitinib e Sorafenib (anti- VEGF-A, -B e -C), e como o Apatinib (anti-VEGFR2), com o objetivo de promover um bloqueio angiogénico mais eficaz. Adicionalmente, prevê-se que a existência de biomarcadores que sustentem este tipo de abordagem terapêutica, como os níveis séricos de VEGFR2 elevados, possa facilitar uma escolha mais apropriada dos candidatos [101].

## **Inibidores da via PI3K-Akt-mTOR**

A cascata PI3K-Akt-mTOR intervém na regulação da proliferação e sobrevivência celular. A ativação da fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) resulta na fosforilação de uma serina proteína cinase, AKT. Esta reação é normalmente antagonizada pelas fosfatases oncosupressoras PTEN e INPP4B. O alvo da rapamicina nas células de mamífero (mTOR) é uma serina proteína cinase que intervém numa fase subsequente da via e é constituinte de dois complexos importantes: mTORC1 (que regula primariamente a tradução proteica) e o mTORC2 (que medeia a ativação de AKT). Adicionalmente, o mTORC2 está sob efeito do mecanismo de feedback negativo por parte do mTORC1 [105].

No caso dos TNBC, mutações nos genes da PTEN e/ou INPP4B estão na gênese de uma atividade aberrante na cascata PI3K-Akt-mTOR [106].

Em estudo *in vitro*, a inibição do mTOR com agentes como a Rapamicina ou o Everolimus mostrou-se ser promissora ao potenciar o efeito da quimioterapia padrão em múltiplas linhagens celulares de TNBC [107,108], no entanto, tais resultados não se refletiram numa melhoria da pCR em ensaios *in vivo*. [109]. Crê-se que esta ineficácia se sustente na inibição seletiva do mTORC1 por parte do Everolimus, cuja a ação inibe inclusivamente o mecanismo de feedback negativo deste complexo sobre o mTORC2, conduzindo consequentemente a uma ativação prolongada da AKT [110].

Uma possível solução promissora para esta questão poderá passar pela inibição sinérgica dual do mTORC1/2 [111].

O inibidor da PI3K, Buparsilib, mostrou evidenciar uma resposta parcial em TNBC num ensaio em fase I, conduzindo à realização de estudos de maior escala, que se encontram a decorrer atualmente [112].

As linhagens celulares das subclasses M e MSL, caracterizadas pelo aumento da transição epitélio-mesenquima e da expressão das vias de sinalização dos fatores de crescimento, foram associadas a maior sensibilidade à inibição PI3K/mTOR [123].

Em suma, a cascata PI3K-AKT-mTOR encontra-se frequentemente hiperativa nos TNBC e representa um alvo para muitos fármacos emergentes, com ensaios a decorrer para aferir o seu potencial terapêutico individual e em combinação potencialmente sinérgica com a quimioterapia padrão ou com outros fármacos em desenvolvimento (caso dos TKI) [113,114].

## **Imunoterapia**

A imunoterapia tem surgido como uma alternativa terapêutica promissora e com bom perfil de segurança no combate ao TNBC [115]. Os dois alvos mais estudados nesta área são o recetor de morte celular programada 1 (PD1) e o seu ligando, PD-L1, que em conjunto participam numa importante etapa da resposta imunológica. Como explicado anteriormente, a expressão de elevados níveis de PD-L1 no leito tumoral está associada à evasão imunológica e à progressão do cancro [116]. Estudos com anticorpos monoclonais anti-PD1, Pembrolizumab, e anti-PD-L1, Atezolizumab, em doentes com TNBC PD-L1 positivos pré-submetidos a terapêutica extensiva, obtiveram resultados promissores, com um rácio de resposta objetiva de redução tumoral em 18.5% e 33%,

respetivamente [117,118]. Esta terapêutica vê-se eficazmente combinada com a quimioterapia e radioterapia, uma vez que a sua ação conduz à destruição celular e à libertação de antígenos associados ao tumor, potenciando a resposta imune [119].

Para além destes agentes, a investigação neste ramo estende-se para além do espectro de ação do PD-1 e PD-L1, com estudos a decorrer incluindo o anticorpo Tremelimumab contra o antígeno associado aos linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4 - antígeno importante na infra-regulação resposta das células T nas fases iniciais) [115].

Das subclasses de TNBC, a IM é aquela que apresenta maiores índices de expressão de PD-L1, PD1 e CTLA-4 [54], podendo ser um grupo particularmente suscetível à ação desta modalidade terapêutica e foco interessante para futuros ensaios mais direcionados.

## **Inibidores do recetor de androgénio (RA)**

Os RA são expressos em cerca de 77% dos casos de cancro da mama primário, mas no caso específico dos TNBC os números reportados têm sido menores, registando-se em 12-60%, principalmente na subclasse LAR (que constituem aproximadamente 10% dos TNBC) [121,122]. A terapêutica alvo com agentes antiagonistas do RA, como a Bicalutamida e a Enzalutamida, inibiram a proliferação, invasão e migração em várias linhagens celulares de TNBC [123], com os ensaios clínicos em TNBC metastático com RA positivo a evidenciarem que ambos os fármacos conseguem induzir uma sobrevivência livre de progressão >12 semanas, com a Enzalutamida a alcançar respostas completas nalgumas das situações [122,124].

Adicionalmente, estudos revelaram que o agente anti-estrogénico Tamoxifeno (que há muito se assumira como inefetivo nos TNBC), poderá reduzir a recorrência dos TNBC, mas apenas naqueles RA positivos [125], o que sugere que este fármaco poderá ter alguma interação com o RA ou com algum dos componentes da sua via de sinalização, merecendo este caso singular ser alvo de investigação futura.

Registaram-se ainda uma proporção de casos de TNBC que co-expressam RA e PD-L1, o que leva a crer que a combinação de antiandrogénicos e imunoterapia poderá vir a ser viável nestes doentes [126]. Estão neste momento em decurso vários ensaios que ajudarão a esclarecer o benefício dos bloqueadores do RA, tanto em monoterapia, como em combinação com os outros fármacos quimioterápicos padrão.

## Conclusão

O TNBC apresenta-se como uma patologia complexa, extremamente agressiva, com elevada taxa de recidiva precoce e com um prognóstico geral reservado quando comparado com os restantes subtipos de cancro da mama.

A comunidade científica e médica tem caminhado recentemente no sentido de desmistificar o TNBC, para que este não seja encarado apenas como um simples subtipo, mas sim como uma entidade clínica heterogénea, caracterizada por diferentes perfis histológicos, subclasses moleculares e uma grande variedade de vias bioquímicas, que conferem distintas sensibilidades terapêuticas e características individuais dentro da mesma doença.

À data, as modalidades de tratamento permanecem escassas tanto em número como eficácia, limitando-se principalmente à quimioterapia padrão e à abordagem cirúrgica, com ou sem radioterapia. Todavia, encontram-se em decurso vários ensaios clínicos promissores que procuram validar novos fármacos dirigidos a alvos específicos e agentes imunoterapêuticos, com o intuito de serem instituídos de acordo com o fenótipo individual da doença.

Entre eles, destacam-se como mais promissores: os agentes platínicos e os inibidores PARP, para os doentes transportadores de mutações BRCA; fármacos antiandrogénicos, para os casos que se apresentarem com positividade para o recetor de androgénios; a imunoterapia, particularmente nos casos associados a elevada infiltração linfocítica no leito tumoral (presença de TILs) ou elevada expressão de PD1, PD-L1 e/ou CTLA-4 no tumor primário. Também em desenvolvimento e provavelmente com um caminho mais longo a percorrer até à sua aplicabilidade clínica: os inibidores do EGFR, selecionando aqueles que se apresentem com amplificação do fator de crescimento epitelial; os inibidores do fator de crescimento endotelial vascular, possivelmente para doentes com elevados níveis séricos de VEGFR2; os inibidores da via PI3K-Akt-mTOR, potencialmente para doentes que apresentem alterações nesta cascata de sinalização.

Não obstante, no que concerne aos ensaios clínicos levados a cabo para apurar a eficácia terapêutica destes novos agentes, poderiam ainda ser aplicadas medidas para combater algumas das limitações com que se deparam:

- 1- Utilização de critérios de inclusão mais específicos, categorizando e selecionando os elementos da amostra de acordo com a subclasse de TNBC a que

pertencem. Para alcançar este panorama, idealmente deveria ocorrer uma uniformização à escala global de um algoritmo de subclassificação dos TNBC, o que à data corrente ainda poderá ser limitado pela falta de compreensão dos mecanismos, de biomarcadores específicos para definir cada perfil e pelos custos que tais técnicas de análise poderiam implicar durante a investigação.

2- Aumentar o tamanho das amostras dos ensaios, o que poderia erguer-se como um grande desafio, particularmente se considerarmos as subclasses de TNBC menos comuns.

3- Conduzir estudos mais aprofundados para melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à doença, identificação de mutações prevalentes e com preponderância para alvos terapêuticos, como o caso dos genes BRCA, e ainda a identificação de biomarcadores fidedignos e fatores de prognóstico que facilitem a previsão do comportamento da doença, como possivelmente o caso dos TIL.

Em última análise, atendendo às recentes descobertas e ao esforço da comunidade científica, que nos últimos anos tem incidido ativamente nesta área, tudo indica que num futuro não longínquo novas modalidades terapêuticas serão combinadas com o tratamento sistémico disponível atualmente, de acordo com o perfil de TNBC individual, potenciando melhores *outcomes* para esta doença e evoluindo para um paradigma de um exercício de medicina personalizada, em detrimento de uma prática generalizada.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família e amigos, por toda paciência, apoio e boas memórias que me ofereceram ao longo do meu percurso académico, sem eles nada seria possível.

Agradeço ainda a disponibilidade, conhecimento, boa disposição e simpatia da Dra. Maria de Lurdes Correia da Encarnação, que se manterá para sempre como um dos melhores exemplos daquilo que significa ser mentor e professor.

Um último agradecimento para o Instituto de Anatomia Patológica, que me facultou os meios e aceitou a realização da minha tese de mestrado.

## Anexo I

### T – Primary tumour

TX	Primary tumour cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumour
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Ductal carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobular carcinoma in situ
Tis (Paget)	Paget disease of the nipple not associated with invasive carcinoma and/or carcinoma in situ (DCIS and/or LCIS) in the underlying breast parenchyma.

**Note:** Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget disease should still be noted.

T1	Tumour 2 cm or less in greatest dimension
T1mi	Microinvasion 0.1 cm or less in greatest dimension*

**Note:** \*Microinvasion is the extension of cancer cells beyond the basement membrane into the adjacent tissues with no focus more than 0.1 cm in greatest dimension. When there are multiple foci of microinvasion, the size of only the largest focus is used to classify the microinvasion. (Do not use the sum of all individual foci.) The presence of multiple foci of microinvasion should be noted, as it is with multiple larger invasive carcinomas.

T1a	More than 0.1 cm but not more than 0.5 cm in greatest dimension
T1b	More than 0.5 cm but not more than 1 cm in greatest dimension
T1c	More than 1 cm but not more than 2 cm in greatest dimension
T2	Tumour more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension
T3	Tumour more than 5 cm in greatest dimension
T4	Tumour of any size with direct extension to chest wall and/or to skin (ulceration or skin nodules)

**Note:** Invasion of the dermis alone does not qualify as T4. Chest wall includes ribs, intercostal muscles, and serratus anterior muscle but not pectoral muscle.

T4a	Extension to chest wall (does not include pectoralis muscle invasion only)
T4b	Ulceration, ipsilateral satellite skin nodules, or skin oedema (including peau d'orange)
T4c	Both 4a and 4b, above
T4d	Inflammatory carcinoma

**Note:** Inflammatory carcinoma of the breast is characterized by diffuse, brawny induration of the skin with an erysipeloid edge, usually with no underlying mass. If the skin biopsy is negative and there is no localized measurable primary cancer, the T category is pTX when pathologically staging a clinical inflammatory carcinoma (T4d). Dimpling of the skin, nipple retraction, or other skin changes, except those in T4b and T4d, may occur in T1, T2, or T3 without affecting the classification.

### N – Regional lymph nodes

NX	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g. previously removed)
N0	No regional lymph-node metastasis
N1	Metastasis in movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s)
N2	Metastasis in ipsilateral level I, II axillary lymph node(s) that are clinically fixed or matted; or in clinically detected* ipsilateral internal mammary lymph node(s) in the absence of clinically evident axillary lymph-node metastasis
N2a	Metastasis in axillary lymph node(s) fixed to one another (matted) or to other structures
N2b	Metastasis only in clinically detected* internal mammary lymph node(s) and in the absence of clinically detected axillary lymph-node metastasis
N3	Metastasis in ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph node(s) with or without level I, II axillary lymph-node involvement; or in clinically detected* ipsilateral internal mammary lymph node(s) with clinically evident level I, II axillary lymph-node metastasis; or metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement
N3a	Metastasis in infraclavicular lymph node(s)
N3b	Metastasis in internal mammary and axillary lymph nodes
N3c	Metastasis in supraclavicular lymph node(s)

**Note:** \* "Clinically detected" is defined as detected by clinical examination or by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) and having characteristics highly suspicious for malignancy or a presumed pathological macrometastasis based on fine-needle aspiration biopsy with cytological examination. Confirmation of clinically detected metastatic disease by fine-needle aspiration without excision biopsy is designated with an (f) suffix, e.g., cN3a(f).

Excisional biopsy of a lymph node or biopsy of a sentinel node, in the absence of assignment of a pT, is classified as a clinical N, e.g., cN1. Pathological classification (pN) is used for excision or sentinel lymph node biopsy only in conjunction with a pathological T assignment.

### M – Distant metastasis

M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

Anexo I – Classificação TMN para tumores da mama segundo WHO – parte I [15].



## Anexo II

### pN – Regional lymph nodes

The pathological classification requires the resection and examination of at least the low axillary lymph nodes (level I). Such a resection will ordinarily include six or more lymph nodes. If the lymph nodes are negative, but the number ordinarily examined is not met, classify as pN0.

pNX Regional lymph nodes cannot be assessed e.g. previously removed, or not removed for study)  
pN0 No regional lymph-node metastasis\*

**Note:** \*Isolated tumour cells (ITC) are single tumour cells or small clusters of cells not more than 0.2 mm in greatest extent that can be detected by routine H & E stains or immunohistochemistry. An additional criterion has been proposed to include a cluster of fewer than 200 cells in a single histological cross-section. Nodes containing only ITCs are excluded from the total positive node count for purposes of N classification and should be included in the total number of nodes evaluated.

pN1 Micrometastasis; or metastasis in 1–3 axillary ipsilateral lymph nodes; and/or in internal mammary nodes with metastasis detected by sentinel lymph-node biopsy but not clinically detected \*

pN1mi Micrometastasis (larger than 0.2 mm and/or more than 200 cells, but none larger than 2.0 mm)

pN1a Metastasis in 1–3 axillary lymph node(s), including at least 1 larger than 2 mm in greatest dimension

pN1b Internal mammary lymph nodes with microscopic or macroscopic metastasis detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected

pN1c Metastasis in 1–3 axillary lymph nodes and internal mammary lymph nodes with microscopic or macroscopic metastasis detected by sentinel lymph-node biopsy but not clinically detected

pN2 Metastasis as described below:

pN2a Metastasis in 4–9 axillary lymph nodes, including at least one that is larger than 2 mm

pN2b Metastasis in clinically detected\* internal mammary lymph node(s), in the absence of axillary lymph-node metastasis

pN3 Metastasis as described below:

pN3a Metastasis in 10 or more axillary lymph nodes (at least one larger than 2 mm) or metastasis in

infraclavicular lymph nodes

pN3b Metastasis in clinically detected\* internal ipsilateral mammary lymph node(s) in the presence of positive axillary lymph node(s); or metastasis in more than 3 axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with microscopic or macroscopic metastasis detected by sentinel lymph-node biopsy but not clinically detected

pN3c Metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s)

**Note:** \* "Clinically detected" is defined as detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or by clinical examination and having characteristics highly suspicious for malignancy or a presumed pathological macrometastasis based on fine-needle aspiration biopsy with cytological examination.

Not clinically detected is defined as not detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or not detected by clinical examination.

### Post-treatment ypN

- Post-treatment ypN should be evaluated as for clinical (pre-treatment) N methods above. The modifier sn is used only if a sentinel-node evaluation was performed after treatment. If no subscript is attached, it is assumed the axillary nodal evaluation was by axillary-node dissection.
- The X classification will be used (ypNX) if no yp post-treatment SN or axillary dissection was performed
- N categories are the same as those used for pN.

### Stage grouping

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T0, T1	N1mi	M0
Stage IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stage IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stage IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stage IIIC	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

A help-desk for specific questions about the TNM classification is available at <http://www.uicc.org>.

### References

- American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti III H. eds. New York: Springer. 2009
- International Union against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumors 7th ed. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. eds. Wiley-Blackwell. Oxford. 2009

## Bibliografia

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359–E386. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> .
2. 1. Autier, P., Boniol, M., La Vecchia, C., LaVecchia, C., Vatten, L., Gavin, A., et al. (2010) Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ (Clinical research ed.)*, 341, c3620. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702548> .
3. Saraiva, D.P., Guadalupe Cabral, M., Jacinto, A. and Braga, S. (2017) How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. *ESMO Open*, 2, e000208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018573> .
4. Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2018) Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 7–30. <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21442> .
5. Engebraaten, O., Vollen, H.K.M. and Børresen-Dale, A.-L. (2013) Triple-Negative Breast Cancer and the Need for New Therapeutic Targets. *The American Journal of Pathology*, 183, 1064–1074. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23920327> .
6. Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., et al. (2004) Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10, 5367–5374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328174> .
7. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 10869–10874. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815> .
8. Rakha, E., Putti, T., Abd El-Rehim, D., Paish, C., Green, A., Powe, D., et al. (2006) Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology*, 208, 495–506. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429394> .

9. van de Rijn, M., Perou, C.M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., et al. (2002) Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *The American journal of pathology*, 161, 1991–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466114> .
10. Cheang, M.C.U., Martin, M., Nielsen, T.O., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., et al. (2015) Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression. *The Oncologist*, 20, 474–482. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25908555> .
11. Krishnamurthy, S., Poornima, R., Challa, V.R. and Goud, Y.G.B. (2012) Triple negative breast cancer - our experience and review. *Indian journal of surgical oncology*, 3, 12–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449631> .
12. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> .
13. Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., et al. (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, 22, 1736–1747. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709140> .
14. Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., et al. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of pathology & laboratory medicine*, 134, e48-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20586616> .
15. Lakhani, Sunil R, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de V.M., International Agency for Research on Cancer and World Health Organization. WHO classification of tumours of the breast. <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Tumours-Of-The-Breast-2012> .
16. Vona-Davis, L., Rose, D.P., Hazard, H., Howard-McNatt, M., Adkins, F., Partin, J., et al. (2008) Triple-Negative Breast Cancer and Obesity in a Rural Appalachian Population. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17, 3319–3324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064545> .

17. Anders, C.K. and Carey, L.A. (2009) Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical breast cancer*, 9 Suppl 2, S73-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596646> ..
18. Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C.U., Anders, C.K., Carey, L.A. and Perou, C.M. (2013) Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 18, 123–133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404817> .
19. Prat, A., Lluch, A., Albanell, J., Barry, W.T., Fan, C., Chacón, J.I., et al. (2014) Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 111, 1532–1541. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101563> .
20. Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T.J., et al. (2017) Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? *Oncotarget*, 8, 1913–1924. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765921> .
21. Rakha, E.A., El-Rehim, D.A., Paish, C., Green, A.R., Lee, A.H.S., Robertson, J.F., et al. (2006) Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *European Journal of Cancer*, 42, 3149–3156. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055256> .
22. Carey, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., et al. (2007) The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research*, 13, 2329–2334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438091> .
23. Gonzalez-Angulo, A.M., Timms, K.M., Liu, S., Chen, H., Litton, J.K., Potter, J., et al. (2011) Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17, 1082–9. <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-10-2560> .
24. Turner, N., Tutt, A. and Ashworth, A. (2004) Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nature Reviews Cancer*, 4, 814–819. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15510162> .
25. Yun, M.H. and Hiom, K. (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459, 460–463. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357644> .

26. Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S.K., Persson, C., Lövgren, K., Jumppanen, M., Staaf, J., et al. (2008) Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nature Genetics*, 40, 102–107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18066063> .
27. Anders, C.K., Deal, A.M., Miller, C.R., Khorram, C., Meng, H., Burrows, E., et al. (2011) The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer*, 117, 1602–11. <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.25746> .
28. Evans, D.G. and Howell, A. (2012) Are We Ready for Online Tools in Decision Making for BRCA1/2 Mutation Carriers? *Journal of Clinical Oncology*, 30, 471–473. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231044> .
29. Atchley, D.P., Albarracin, C.T., Lopez, A., Valero, V., Amos, C.I., Gonzalez-Angulo, A.M., et al. (2008) Clinical and Pathologic Characteristics of Patients With BRCA -Positive and BRCA -Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 4282–4288. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779615> .
30. Daly, M.B., Pilarski, R., Axilbund, J.E., Berry, M., Buys, S.S., Crawford, B., et al. (2016) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 14, 153–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26850485> .
31. Trivers, K.F., Lund, M.J., Porter, P.L., Liff, J.M., Flagg, E.W., Coates, R.J., et al. (2009) The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer causes & control : CCC*, 20, 1071–82. <http://link.springer.com/10.1007/s10552-009-9331-1> .
32. Millikan, R.C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P.G., Conway, K., Smith, L. V., et al. (2008) Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 109, 123–139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578664> .
33. Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., et al. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295, 2492–502. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.295.21.2492> .
34. Parise, C.A., Bauer, K.R., Brown, M.M. and Caggiano, V. (2009) Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with

- invasive breast cancer in California, 1999-2004. *The breast journal*, 15, 593–602. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-4741.2009.00822.x> .
35. Phipps, A.I., Chlebowski, R.T., Prentice, R., McTiernan, A., Wactawski-Wende, J., Kuller, L.H., et al. (2011) Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103, 470–7. <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djr030> .
  36. Palmer, J.R., Viscidi, E., Troester, M.A., Hong, C.-C., Schedin, P., Bethea, T.N., et al. (2014) Parity, lactation, and breast cancer subtypes in African American women: results from the AMBER Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 106. <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dju237> .
  37. Anderson, K.N., Schwab, R.B. and Martinez, M.E. (2014) Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast cancer research and treatment*, 144, 1–10. <http://link.springer.com/10.1007/s10549-014-2852-7> .
  38. Pierobon, M. and Frankenfeld, C.L. (2013) Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 137, 307–14. <http://link.springer.com/10.1007/s10549-012-2339-3> .
  39. Theriault, R.L., Litton, J.K., Mittendorf, E.A., Chen, H., Meric-Bernstam, F., Chavez-Macgregor, M., et al. (2011) Age and survival estimates in patients who have node-negative T1ab breast cancer by breast cancer subtype. *Clinical breast cancer*, 11, 325–31. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820911000826> .
  40. Direcção-Geral da Saúde, Ministério da Saúde. (2011). Norma nº051/2011 Abordagem Imagiológica da Mama Feminina. [www.dgs.pt/?cr=21528](http://www.dgs.pt/?cr=21528).
  41. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., et al. (2007) Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13, 4429–4434. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671126> .
  42. Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M.C.U., Voduc, D., Speers, C.H., et al. (2010) Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 3271–3277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394> .

43. Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A.M., Yu, J., Klijn, J.G.M., et al. (2008) Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Research*, 68, 3108–3114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451135> .
44. Harrell, J.C., Prat, A., Parker, J.S., Fan, C., He, X., Carey, L., et al. (2012) Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast cancer research and treatment*, 132, 523–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671017> .
45. Heusinger, K., Jud, S.M., Häberle, L., Hack, C.C., Adamietz, B.R., Meier-Meitingner, M., et al. (2012) Association of mammographic density with hormone receptors in invasive breast cancers: Results from a case-only study. *International Journal of Cancer*, 131, 2643–2649. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392346> .
46. Yang, W.-T., Dryden, M., Broglio, K., Gilcrease, M., Dawood, S., Dempsey, P.J., et al. (2008) Mammographic features of triple receptor-negative primary breast cancers in young premenopausal women. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111, 405–410. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18026834> .
47. Wang, Y., Ikeda, D.M., Narasimhan, B., Longacre, T.A., Bleicher, R.J., Pal, S., et al. (2008) Estrogen Receptor–Negative Invasive Breast Cancer: Imaging Features of Tumors with and without Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2 Overexpression. *Radiology*, 246, 367–375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180338> .
48. 1. Dogan, B.E., Gonzalez-Angulo, A.M., Gilcrease, M., Dryden, M.J. and Yang, W.T. (2010) Multimodality Imaging of Triple Receptor–Negative Tumors With Mammography, Ultrasound, and MRI. *American Journal of Roentgenology*, 194, 1160–1166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308526> .
49. Ko, E.S., Lee, B.H., Kim, H.-A., Noh, W.-C., Kim, M.S. and Lee, S.-A. (2010) Triple-negative breast cancer: correlation between imaging and pathological findings. *European Radiology*, 20, 1111–1117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898850> .
50. Lerma, E., Peiro, G., Ramón, T., Fernandez, S., Martinez, D., Pons, C., et al. (2007) Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). *Modern Pathology*, 20, 1200–1207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17885672> .



51. Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Baehner, F., Dabbs, D.J., Decker, T., Eusebi, V., et al. (2010) Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research : BCR*, 12, 207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804570> .
52. Lehmann, B.D. and Pietenpol, J.A. (2015) Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer. *The Breast*, 24, S36–S40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26253813> .
53. Gao, R., Davis, A., McDonald, T.O., Sei, E., Shi, X., Wang, Y., et al. (2016) Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nature Genetics*, 48, 1119–1130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27526321> .
54. Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., et al. (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 2750–2767. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633166> .
55. Masuda, H., Baggerly, K.A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Meric-Bernstam, F., et al. (2013) Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clinical Cancer Research*, 19, 5533–5540. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948975> .
56. Collett, K., Stefansson, I.M., Eide, J., Braaten, A., Wang, H., Eide, G.E., et al. (2005) A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14, 1108–12. <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-04-0394> .
57. Foulkes, W.D., Smith, I.E. and Reis-Filho, J.S. (2010) Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363, 1938–1948. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067385> .
58. Weigelt, B. and Reis-Filho, J.S. (2009) Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6, 718–730. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942925> .

59. Carraro, D.M., Elias, E. V and Andrade, V.P. (2014) Ductal carcinoma in situ of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. *Bioscience reports*, 34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27919043> .
60. Kong, D., Liu, Y., Liu, Q., Han, N., Zhang, C., Pestell, R.G., et al. (2016) The retinal determination gene network: from developmental regulator to cancer therapeutic target. *Oncotarget*, 7, 50755–50765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27203207> .
61. Weigelt, B., Eberle, C., Cowell, C.F., Ng, C.K.Y. and Reis-Filho, J.S. (2014) Metaplastic breast carcinoma: more than a special type. *Nature reviews. Cancer*, 14, 147–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25688406> .
62. Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., et al. (2013) Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology*, 31, 860–867. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341518> .
63. Rakha, E.A., Aleskandarany, M., El-Sayed, M.E., Blamey, R.W., Elston, C.W., Ellis, I.O., et al. (2009) The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *European Journal of Cancer*, 45, 1780–1787. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286369> .
64. Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., et al. (2005) Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 24, 4660–4671. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897907> .
65. Neven, P., Brouckaert, H., Wildiers, G. and Floris, P. (2012) Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *International Journal of Women's Health*, 4, 511. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071421> .
66. Montagna, E., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Canello, G., Iorfida, M., Balduzzi, A., et al. (2013) Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer: Histologic Subtyping to Inform the Outcome. *Clinical Breast Cancer*, 13, 31–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23098574> .

67. Miyai, K., Schwartz, M.R., Divatia, M.K., Anton, R.C., Park, Y.W., Ayala, A.G., et al. (2014) Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances. *World journal of clinical cases*, 2, 732–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516849> .
68. Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E. and Gianni, L. (2016) Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13, 674–690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184417> (5 July 2018).
69. Peng, Y. (2012) Potential prognostic tumor biomarkers in triple-negative breast carcinoma. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences*, 44, 666–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073572> .
70. Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K.R., André, F., Tordai, A., Mejia, J.A., et al. (2008) Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 1275–1281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250347> .
71. Ravelli, A., Roviello, G., Cretella, D., Cavazzoni, A., Biondi, A., Cappelletti, M.R., et al. (2017) Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumor Biology*, 39, 101042831769502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28378631> .
72. Adams, S., Goldstein, L.J., Sparano, J.A., Demaria, S. and Badve, S.S. (2015) Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) improve prognosis in patients with triple negative breast cancer (TNBC). *Oncoimmunology*, 4, e985930. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26405612> .
73. Eiermann, W. and Vallis, K.A. (2012) Locoregional treatments for triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 23, vi30-vi34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012299> .
74. Straver, M.E., Glas, A.M., Hannemann, J., Wesseling, J., van de Vijver, M.J., Rutgers, E.J.T., et al. (2010) The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119, 551–558. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214742> .
75. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Clarke, M., Coates, A.S., Darby, S.C., Davies, C., Gelber, R.D., et al. (2008) Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, 371, 29–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177773> .

76. Berry, D.A., Cirincione, C., Henderson, I.C., Citron, M.L., Budman, D.R., Goldstein, L.J., et al. (2006) Estrogen-Receptor Status and Outcomes of Modern Chemotherapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer. *JAMA*, 295, 1658. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609087> .
77. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto, R., Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Pan, H.C., et al. (2012) Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet*, 379, 432–444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152853> .
78. Metzger-Filho, O., Tutt, A., de Azambuja, E., Saini, K.S., Viale, G., Loi, S., et al. (2012) Dissecting the Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 1879–1887. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454417> .
79. Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., et al. (2005) Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 11, 5678–5685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115903> .
80. Oualla, K., El-Zawahry, H.M., Arun, B., Reuben, J.M., Woodward, W.A., Gamal El-Din, H., et al. (2017) Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*, 9, 493–511. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28717401> .
81. Huober, J., von Minckwitz, G., Denkert, C., Tesch, H., Weiss, E., Zahm, D.M., et al. (2010) Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124, 133–140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697801> .
82. Joensuu, H. and Gligorov, J. (2012) Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Annals of Oncology*, 23, vi40–vi45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012301>
83. Amir, E., Miller, N., Geddie, W., Freedman, O., Kassam, F., Simmons, C., et al. (2012) Prospective Study Evaluating the Impact of Tissue Confirmation of Metastatic Disease in Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 587–592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124102> .

84. Perez, E.A., Patel, T. and Moreno-Aspitia, A. (2010) Efficacy of ixabepilone in ER/PR/HER2-negative (triple-negative) breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121, 261–271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20229176> .
85. Byrski, T., Huzarski, T., Dent, R., Marczyk, E., Jasiowka, M., Gronwald, J., et al. (2014) Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147, 401–405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129345> .
86. Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., et al. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, 917–921. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829967> .
87. Gelmon, K.A., Hirte, H.W., Robidoux, A., Tonkin, K.S., Tischkowitz, M., Swenerton, K., et al. (2010) Can we define tumors that will respond to PARP inhibitors? A phase II correlative study of olaparib in advanced serous ovarian cancer and triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 3002–3002. [http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2010.28.15\\_suppl.3002](http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.3002) (9 June 2018)
88. Dent, R.A., Lindeman, G.J., Clemons, M., Wildiers, H., Chan, A., McCarthy, N.J., et al. (2013) Phase I trial of the oral PARP inhibitor olaparib in combination with paclitaxel for first- or second-line treatment of patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 15, R88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24063698> .
89. Balmaña, J., Tung, N.M., Isakoff, S.J., Graña, B., Ryan, P.D., Saura, C., et al. (2014) Phase I trial of olaparib in combination with cisplatin for the treatment of patients with advanced breast, ovarian and other solid tumors. *Annals of Oncology*, 25, 1656–1663. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827126> .
90. Lee, J.-M., Hays, J.L., Annunziata, C.M., Noonan, A.M., Minasian, L., Zujewski, J.A., et al. (2014) Phase I/Ib Study of Olaparib and Carboplatin in BRCA1 or BRCA2 Mutation-Associated Breast or Ovarian Cancer With Biomarker Analyses. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106, dju089. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24842883> .
91. O'Shaughnessy, J., Schwartzberg, L., Danso, M.A., Miller, K.D., Rugo, H.S., Neubauer, M., et al. (2014) Phase III Study of Iniparib Plus Gemcitabine and

- Carboplatin Versus Gemcitabine and Carboplatin in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 3840–3847. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349301> .
92. Lehmann, B.D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K.N., Shyr, Y., et al. (2016) Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLOS ONE*, 11, e0157368. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27310713> .
  93. Eccles, S.A. (2011) The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International Journal of Developmental Biology*, 55, 685–696. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22161825> .
  94. Ueno, N.T. and Zhang, D. (2011) Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer*, 2, 324–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716849> .
  95. Baselga, J., Gómez, P., Greil, R., Braga, S., Climent, M.A., Wardley, A.M., et al. (2013) Randomized Phase II Study of the Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31, 2586–2592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733761> .
  96. 1. Carey, L.A., Rugo, H.S., Marcom, P.K., Mayer, E.L., Esteva, F.J., Ma, C.X., et al. (2012) TBCRC 001: Randomized Phase II Study of Cetuximab in Combination With Carboplatin in Stage IV Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 2615–2623. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665533> .
  97. Cardillo, T.M., Sharkey, R.M., Rossi, D.L., Arrojo, R., Mostafa, A.A. and Goldenberg, D.M. (2017) Synthetic Lethality Exploitation by an Anti-Trop-2-SN-38 Antibody-Drug Conjugate, IMMU-132, Plus PARP Inhibitors in BRCA1/2 –wild-type Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23, 3405–3415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28069724> .
  98. Bahnassy, A., Mohanad, M., Ismail, M.F., Shaarawy, S., El-Bastawisy, A. and Zekri, A.-R.N. (2015) Molecular biomarkers for prediction of response to treatment and survival in triple negative breast cancer patients from Egypt.

- Experimental and molecular pathology, 99, 303–11.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232605> .
99. Schneider, B.P. and Miller, K.D. (2005) Angiogenesis of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 1782–1790.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755986> .
  100. Brufsky, A., Valero, V., Tiangco, B., Dakhil, S., Brize, A., Rugo, H.S., et al. (2012) Second-line bevacizumab-containing therapy in patients with triple-negative breast cancer: subgroup analysis of the RIBBON-2 trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133, 1067–1075.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22415477> .
  101. Cameron, D., Brown, J., Dent, R., Jackisch, C., Mackey, J., Pivot, X., et al. (2013) Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 14, 933–942. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932548> .
  102. Robert, N.J., Diéras, V., Glaspy, J., Brufsky, A.M., Bondarenko, I., Lipatov, O.N., et al. (2011) RIBBON-1: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab for First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative, Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 1252–1260. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383283> .
  103. Brufsky, A.M., Hurvitz, S., Perez, E., Swamy, R., Valero, V., O'Neill, V., et al. (2011) RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 4286–4293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990397> .
  104. D'Agostino, R.B. (2011) Changing End Points in Breast-Cancer Drug Approval — The Avastin Story. *New England Journal of Medicine*, 365, e2.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707384> .
  105. Fouqué, A., Jean, M., Weghe, P. van de and Legembre, P. (2016) Review of PI3K/mTOR Inhibitors Entering Clinical Trials to Treat Triple Negative Breast Cancers. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 11, 283–96.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27194555> .



106. Cossu-Rocca, P., Orrù, S., Muroi, M.R., Sanges, F., Sotgiu, G., Ena, S., et al. (2015) Analysis of PIK3CA Mutations and Activation Pathways in Triple Negative Breast Cancer. PLOS ONE, 10, e0141763. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26540293> .
107. Mondesire, W.H., Jian, W., Zhang, H., Ensor, J., Hung, M.-C., Mills, G.B., et al. (2004) Targeting Mammalian Target of Rapamycin Synergistically Enhances Chemotherapy-Induced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. Clinical Cancer Research, 10, 7031–7042. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501983> .
108. Wong, S.W., Tiong, K.H., Kong, W.Y., Yue, Y.C., Chua, C.H., Lim, J.Y., et al. (2011) Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. Breast Cancer Research and Treatment, 128, 301–313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686837> .
109. Gonzalez-Angulo, A.M., Akcakanat, A., Liu, S., Green, M.C., Murray, J.L., Chen, H., et al. (2014) Open-label randomized clinical trial of standard neoadjuvant chemotherapy with paclitaxel followed by FEC versus the combination of paclitaxel and everolimus followed by FEC in women with triple receptor-negative breast cancer†. Annals of Oncology, 25, 1122–1127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669015> .
110. Mayer, I.A. and Arteaga, C.L. (2016) The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. Annual Review of Medicine, 67, 11–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473415> .
111. Leung, E.Y., Askarian-Amiri, M., Finlay, G.J., Rewcastle, G.W. and Baguley, B.C. (2015) Potentiation of Growth Inhibitory Responses of the mTOR Inhibitor Everolimus by Dual mTORC1/2 Inhibitors in Cultured Breast Cancer Cell Lines. PLOS ONE, 10, e0131400. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131400> .
112. Bendell, J.C., Rodon, J., Burris, H.A., de Jonge, M., Verweij, J., Birle, D., et al. (2012) Phase I, Dose-Escalation Study of BKM120, an Oral Pan-Class I PI3K Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. Journal of Clinical Oncology, 30, 282–290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162589> .
113. YU, F., ZHAO, J., HU, Y., ZHOU, Y., GUO, R., BAI, J., et al. (2016) The combination of NVP-BKM120 with trastuzumab or RAD001 synergistically inhibits the growth of breast cancer stem cells in vivo. Oncology Reports, 36, 356–364. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27175939> .

114. Liu, T., Yacoub, R., Taliaferro-Smith, L.D., Sun, S.-Y., Graham, T.R., Dolan, R., et al. (2011) Combinatorial Effects of Lapatinib and Rapamycin in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, 1460–1469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690228> .
115. McArthur, H.L. and Page, D.B. (2016) Immunotherapy for the treatment of breast cancer: checkpoint blockade, cancer vaccines, and future directions in combination immunotherapy. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*, 14, 922–933. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27930644> .
116. Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H. and Jerusalem, G. (2016) Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 8, 93–107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27284266> .
117. Emens, L.A., Braithe, F.S., Cassier, P., DeLord, J.-P., Eder, J.P., Shen, X., et al. (2015) Abstract PD1-6: Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, 75, PD1-6-PD1-6. <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.SABCS14-PD1-6> .
118. Nanda, R., Chow, L.Q.M., Dees, E.C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., et al. (2016) Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *Journal of Clinical Oncology*, 34, 2460–2467. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27138582> .
119. Adams S, Diamond JR, Hamilton EP, Pohlmann PR, Tolaney SM, Molinero L, et al. (2016) Phase Ib trial of atezolizumab in combination with nab-paclitaxel in patients with metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *J Clin Oncol*, 2016: 10.1200/JCO.2016.34.15\_SUPPL.1009.
120. Du, T., Zhu, L., Levine, K.M., Tasdemir, N., Lee, A. V, Vignali, D.A.A., et al. (2018) Invasive lobular and ductal breast carcinoma differ in immune response, protein translation efficiency and metabolism. *Scientific reports*, 8, 7205. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29739984> .
121. Vera-Badillo, F.E., Templeton, A.J., de Gouveia, P., Diaz-Padilla, I., Bedard, P.L., Al-Mubarak, M., et al. (2014) Androgen Receptor Expression and Outcomes in Early Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 106, djt319-djt319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273215> .

122. Gucalp, A., Tolaney, S., Isakoff, S.J., Ingle, J.N., Liu, M.C., Carey, L.A., et al. (2013) Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor-Positive, Estrogen Receptor-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19, 5505–5512. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965901> .
123. Caiazza, F., Murray, A., Madden, S.F., Synnott, N.C., Ryan, E.J., O'Donovan, N., et al. (2016) Preclinical evaluation of the AR inhibitor enzalutamide in triple-negative breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 23, 323–334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26932782> .
124. Traina T., Miller K., Yardley D., O'Shaughnessy J., Cortes J., Awada A., et al. (2015) Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol*, 2015.
125. Hilborn, E., Gacic, J., Fornander, T., Nordenskjöld, B., Stål, O. and Jansson, A. (2016) Androgen receptor expression predicts beneficial tamoxifen response in oestrogen receptor- $\alpha$ -negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 114, 248–255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742006> .
126. Tung, N., Garber, J.E., Hacker, M.R., Torous, V., Freeman, G.J., Poles, E., et al. (2016) Prevalence and predictors of androgen receptor and programmed death-ligand 1 in BRCA1-associated and sporadic triple-negative breast cancer. *npj Breast Cancer*, 2, 16002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28721372> .
127. Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Wolff, A.C., Mangu, P.B. and Temin, S. (2010) American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of oncology practice*, 6, 195–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037871> .
128. Hubalek, M., Czech, T. and Müller, H. (2017) Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 12, 8–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28611535> .
129. Gucalp, A., Tolaney, S., Isakoff, S.J., Ingle, J.N., Liu, M.C., Carey, L.A., et al. (2013) Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor-Positive, Estrogen Receptor-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19, 5505–5512. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965901> .

130. Andreopoulou, E., Kelly, C.M. and McDaid, H.M. (2017) Therapeutic Advances and New Directions for Triple-Negative Breast Cancer. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 12, 21–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28611537> .
131. Weisman, P.S., Ng, C.K.Y., Brogi, E., Eisenberg, R.E., Won, H.H., Piscuoglio, S., et al. (2016) Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Modern Pathology*, 29, 476–488. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26939876> .